

**Universidade de Lisboa**  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



# **IDENTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DE ANTI-CHECKPOINT NOS TELÓMEROS**

Vanessa de Sousa Ferreira Borges

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007



**Universidade de Lisboa**  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Vegetal



# **IDENTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE DE ANTI-CHECKPOINT NOS TELÓMEROS**

Dissertação de mestrado sob a orientação de:

Professor Júlio Duarte, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Doutor Miguel Godinho Ferreira, Instituto Gulbenkian de Ciência

Vanessa de Sousa Ferreira Borges

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007

“I have not failed. I've just found 10,000 ways that won't work.”

*Thomas Edison*

Porque um dia descobri a Biologia Molecular e Genética, um mundo de puzzles e quebra-cabeças por decifrar. E a partir desse dia a investigação tornou-se parte de mim. Um longo caminho de altos e baixos, com momentos de enorme alegria e momentos em que nos sentimos completamente perdidos. E porque é nesses momentos que mais precisamos de orientação e apoio, quero agradecer às pessoas que me ajudam a percorrer esse caminho...

...Ao Doutor Miguel Godinho Ferreira, pela oportunidade de realizar o estágio de mestrado no Laboratório de Telómeros e Estabilidade Genómica, por tudo o que me ensinou ao longo deste ano, pela disponibilidade e apoio constantes. Por ser mais do que um orientador.

...Ao Professor Doutor Júlio Duarte, por ter aceite ser o meu orientador interno de Mestrado.

...Ao meu grupo de laboratório. À Sílvia pelas gargalhadas, ao Hugo pelos abraços, à Clara pela força que transmite, e ao Miguel pela boa disposição. Por me ensinarem o que é ter um ótimo ambiente de trabalho.

...Ao Tiago, meu companheiro de noites no IGC, um agradecimento especial por todo o trabalho, todas as horas passadas ao microscópio, todos os *time-courses* realizados. Por estar sempre disponível para ensinar e ajudar.

...À Catarina, a minha menzinha, pela partilha de angústias e alegrias ao longo destes últimos cinco anos. Porque é muito importante ter alguém com quem traçar um bom plano! Porque há pessoas que entram na nossa vida e passam a fazer parte dela como se sempre lá tivessem estado.

...À Eliane, a minha Maria, pelas conversas sem fim. Por estar sempre apenas a alguns degraus de distância à minha espera para um solzinho. Porque a distância não importa quando há uma amizade assim...

...À Inês, ao João e à Catarina Tavares, pelas nossas noites de 6ª feira.

...Ao Nuno, por ter entrado na minha vida e permanecido de uma forma muito especial. Por estar sempre presente e acreditar em mim de olhos fechados...

...À Nana, minha alma gémea, por permanecer eternamente de mão dada e me ir guiando ao longo da vida.

...À minha família, pelo apoio incondicional. Por me terem dado asas para voar Por tudo...

Muito obrigado a todos

## Índice

Agradecimentos.....	I
Índice.....	II
Símbolos e Abreviaturas.....	IV
Resumo e Palavras-chave.....	V
Abstract and Keywords.....	VI

## 1 – Introdução

1.1 Telómeros.....	1
1.1.1 Proteínas constituintes dos telómeros.....	2
1.1.2 A proteína Pot1.....	3
1.1.3 Replicação dos telómeros e telomerase.....	4
1.2 Ciclo celular e activação de <i>checkpoints</i> em <i>S. pombe</i> .....	5
1.3 Telómeros vs quebras de dano do DNA.....	6
1.3.1 Recombinação homóloga e Fusão de extremidades não homólogas .....	7
1.3.2 Ciclo de quebra-fusão-ponte.....	8
Tese.....	9

## 2 – Materiais e Métodos

2.1 Estirpes de <i>S. pombe</i> e meios de cultura.....	10
2.2 Construção das estirpes de <i>S. pombe</i> .....	10
2.2.1 Amplificação de DNA através da reacção de polimerização em cadeia (PCR).....	11
2.2.2 Transformação de células de <i>S. pombe</i> .....	12

2.2.3 Confirmação da transformação e estado de ploidia das estirpes.....	13
2.3 Esporulação das estirpes de <i>S. pombe</i> .....	14
2.4 Germinação e selecção dos esporos.....	14
2.5 Recolha de amostras após germinação dos esporos.....	14
2.6 Análise Microscópica.....	15
2.6.1 Aquisição de imagens.....	15
2.6.2 Medição das células.....	15
2.7 Análise Proteica.....	15
2.7.1 Preparação de extractos proteicos.....	15
2.7.2 Resolução de proteínas por electroforese em gel de poliacrilamida SDS.....	15
2.7.3 Immunoblot (Western Blot) .....	16

### 3 – Resultados

3.1 Remoção de Pot1 resulta na desprotecção dos telómeros e activação de <i>checkpoints</i> .....	17
3.2 Os efeitos celulares da inactivação de Pot1 são mediados por Rad3/ATR.....	20
3.3 A remoção de Pot1 de telómeros <i>tazI</i> de <i>S. pombe</i> conduz à fosforilação de Chk1.....	22

### 4 – Discussão

Discussão.....	24
----------------	----

### 5 – Bibliografia

Referências Bibliográficas.....	28
---------------------------------	----

### Anexos

## Símbolos e abreviaturas

**ALT** – ‘Alternative Lenghtening of Telomeres’

**ATM** – ‘Ataxia-telangiectasia-mutated’

**ATR** – ‘Ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related’

**DAPI** – ‘4',6-diamidino-2-phenylindole’

**EDTA** – Ácido etilenodiamina tetraacético

**EMM** – ‘Edinburgh minimal medium’

**pb** – pares de bases

**DLG** – Domínio de ligação Gal4

**DNA** – “Deoxyribonucleic Acid” – Ácido Desoxirribonucleico

**DSBs** – ‘Double-Strand Break’ – Quebra de dano do DNA

**h** - horas

**hPot1** – ‘human Pot1’ – Pot1 de humanos

**HRP** – ‘Horseradish Peroxidase’ - Peroxidase do rábano silvestre

**kb** – quilobases

**kDa** – quilodalton

**min** – minuto

**NHEJ** – ‘Non-Homologous End Joining’ – Fusão de extremidades não-homólogas

**PCR** – ‘Polymerase chain reaction’ – Reacção de polimerização em cadeia

**PEG** – Polietilenoglicol

**RNA** – “Ribonucleic Acid” – Ácido Ribonucleico

**rpm** – rotações por minuto

***S. pombe*** – *Schizosaccharomyces pombe*

**SDS-PAGE** – ‘Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis’

**seg** – segundo

**TA** – Temperatura ambiente

**TBS** – ‘Tris-buffered saline’

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TE** – Tris-EDTA

**TERT** – ‘Telomerase Reverse Transcriptase’

**YES** – ‘Yeast extract with supplements’

**5FOA** – Ácido 5-fluororótico

**°C** – graus Celsius



## Resumo

Os telómeros são as estruturas que protegem as extremidades dos cromossomas lineares. Diferem das quebras no DNA induzidas por dano uma vez que nos telómeros não ocorre activação das vias de reparação do DNA nem activação das vias de *checkpoint* de danos do DNA. A reparação de DNA em telómeros disfuncionais provoca fusões das extremidades dos cromossomas - uma fonte da instabilidade genómica e um passo importante na tumorigénese.

A proteína de ligação aos telómeros de levedura de fissão, Taz1, previne as extremidades dos cromossomas de serem reconhecidas como DNA danificado. Na ausência de Taz1, os telómeros são expostos a processos de reparação que actuam nas quebras de DNA. Contudo, em condições normais, os *checkpoints* de dano no DNA permanecem ausentes em células *taz1<sup>-</sup>*. Assim, os telómeros parecem ter funções separadas na prevenção dos *checkpoints* e na reparação de DNA nas extremidades dos cromossomas.

O nosso candidato como proteína de anti-checkpoint é a proteína Pot1, a qual se liga à cadeia simples do DNA telomérico. Disrupção do gene *pot1<sup>+</sup>* da levedura de fissão tem um efeito imediato na estabilidade cromossómica, originando uma perda rápida do DNA telomérico e circularização cromossómica. hPot1 protege as extremidades cromossómicas de recombinação ilegítima, instabilidade cromossómica catastrófica e segregação cromossómica anormal, sendo desta forma essencial para a viabilidade celular.

Neste estudo mostramos que a remoção de Pot1 de um telómero *taz1<sup>-</sup>* promove o alongamento celular e a fosforilação de Chk1 – sinais da activação de *checkpoint*. Para além disso, o fenótipo normal é recuperado aquando da deleção de *rad3<sup>-</sup>*, a cinase de *checkpoint* da via ATR nas células de fissão. Estes resultados indicam que Pot1 é o componente chave na prevenção da activação dos *checkpoints* de dano do DNA nos telómeros.

**Palavras-chave:** telómeros, Pot1, quebras de dano do DNA, *checkpoint*.

## Abstract

Telomeres are the structures that cap the ends of linear chromosomes. They differ from damage-induced double-strand breaks (DSBs) in that they activate neither DNA repair nor DNA damage checkpoint pathways. DNA repair at dysfunctional telomeres leads to chromosome-end fusions - a source of genomic instability and a step in tumourigenesis.

The fission yeast telomere binding protein Taz1 prevents chromosome-ends from being recognized as DNA damage. In the absence of Taz1, telomeres are exposed to repair processes that act on DNA damage-induced DSBs. However, DNA damage checkpoints are absent in *taz1<sup>-</sup>* cells grown in normal conditions. Thus, telomeres appear to have two separable functions in preventing DNA damage checkpoints and DNA repair at chromosome ends.

Our candidate as the anti-checkpoint protein is Pot1, the single-stranded telomeric DNA-binding protein. Deletion of the fission yeast *pot1<sup>+</sup>* gene has an immediate effect on chromosome stability, causing rapid loss of telomeric DNA and chromosome circularization. hPot1 is essential for cell viability, since it protects chromosome ends from illegitimate recombination, catastrophic chromosome instability and abnormal chromosome segregation.

Here we show that the removal of Pot1 from a *taz1<sup>-</sup>* telomere elicits cell elongation and Chk1 phosphorylation – landmarks of checkpoint activation. Furthermore, the normal phenotype is rescued upon the deletion of *rad3<sup>-</sup>*, the ATR checkpoint kinase in fission yeast. This indicates that Pot1 is the key component preventing activation of DNA damage checkpoints at the telomeres.

**Keywords:** telomeres, Pot1, DSBs, checkpoint.

## Introdução

### 1.1 Telómeros

O interesse pela compreensão das propriedades dos telómeros começou no final dos anos 1930, com trabalhos pioneiros dos geneticistas Hermann Müller (1890-1967) e Barbara McClintock (1902-1992). Muller e McClintock definiram os telómeros como estruturas funcionais que protegem as extremidades dos cromossomas.

Os telómeros são constituídos por sequências repetitivas de DNA não codificante, TTAGGG nos vertebrados e sequências relacionadas na maioria dos restantes eucariotas ((TTAC(A)G<sub>1-6</sub> em levedura de fissão), terminando numa projecção 3' rica em resíduos G. Estas sequências repetitivas de DNA variam em comprimento, existindo telómeros com apenas 50pb nos protozoários ciliados, cerca de 300pb em levedura, e até vários quilobases em células de mamíferos.

Os telómeros apresentam um papel essencial na manutenção da integridade genómica, permitindo a replicação do DNA das extremidades cromossomais sem perda de informação genética. Por outro lado, a estrutura telomérica evita a acção da maquinaria de vigilância do DNA danificado e dos processos de reparação do DNA que ocorrem em quebras genuínas de DNA, permitindo à célula distinguir entre danos do DNA e extremidades naturais dos cromossomas.

Actualmente, são propostos dois modelos de telómeros: o modelo linear, em que as extremidades dos cromossomas permanecem com o DNA numa estrutura linear sendo os complexos proteicos que se ligam ao DNA determinantes na protecção, e o modelo do *t-loop*, no qual a projecção 3' de cadeia simples é sequestrada numa estrutura semelhante a um laço, ocultando a extremidade dentro da dupla cadeia (Griffith et al., 1999; de Lange, 2004, Figura 1 em anexo).

A levedura de fissão *Schizosaccharomyces pombe* é um organismo unicelular, em que o genoma contém cerca de 4900 genes espalhados por apenas três cromossomas (Wood et al., 2002). A fácil manipulação genética e a semelhança da organização e dinâmica cromossomais desta levedura com eucariotas superiores tornam este organismo num bom modelo de estudo da biologia dos telómeros.

### 1.1.1 Proteínas constituintes dos telómeros

As sequências de DNA telomérico são reconhecidas por proteínas de ligação específicas, as quais, por sua vez, estabelecem interações com outras proteínas. Em conjunto, estes constituintes formam o revestimento do telómero, estrutura que inibe eventos que podem conduzir a uma profunda perturbação da integridade genómica, tais como de recombinação inapropriada, degradação nucleolítica e fusões dos telómeros com outras extremidades (Ferreira et al, 2004).

Em *S. pombe*, as sequências teloméricas de dupla cadeia servem de ligação à proteína Taz1, ortóloga das proteínas humanas TRF1 e TRF2 (Cooper et al, 1997; Li et al, 2000). Taz1 é uma proteína essencial na protecção dos telómeros, levando a sua perda à manifestação de várias disfunções. A disrupção de *taz1*<sup>+</sup> resulta num alongamento das sequências repetitivas das regiões de dupla cadeia do DNA telomérico, desregulação da projecção de cadeia simples 3' (Cooper et al., 1997; Tomita et al., 2003), perda da estrutura heterocromática e desrepressão da transcrição de genes adjacentes às sequências teloméricas. Em condições favoráveis, há ocorrência de fusões de extremidades não homólogas (NHEJ) nas células *taz1*<sup>-</sup>. Assim, estas células acumulam fusões entre as extremidades dos cromossomas e perdem viabilidade (Ferreira e Cooper, 2001; Tuzon, 2004).

As proteínas Rap1 e Rif1 ligam-se aos telómeros por interacção com Taz1. Em *S. pombe*, a remoção de Rap1 origina o alongamento dos telómeros, desrepressão do silenciamento telomérico e defeitos na meiose, problemas remanescentes do fenótipo observado em células *taz1*<sup>-</sup> (Chikashige e Hiraoka, 2001; Kanoh e Ishikawa, 2001). Assim, algumas das funções de Taz1 são mediadas pelo recrutamento de Rap1 aos telómeros. Paralelamente, a remoção de Rif1 resulta em células com os telómeros ligeiramente alongados e uma perda parcial na viabilidade de esporos meióticos (Kanoh e Ishikawa, 2001). Resultados recentes sugerem que a proteína Taz1 recruta distintos complexos teloméricos funcionais, um envolvendo Rap1 e um independente de Rap1, exercendo também as proteínas Rap1 e Rif1 actividades nos telómeros independentes de Taz1 (Miller et al., 2005). Rap1 e Taz1 funcionam em conjunto de modo a controlar a telomerase e a formação da extremidade 3', prevenindo ainda fusões entre telómeros. A proteína Rif1 intervém numa via inibitória da telomerase, independente de Rap1. Para além destas, há ainda a ligação de outras proteínas aos telómeros. A proteína Pot1 é a única proteína conhecida que se liga à região de cadeia simples do DNA telomérico, conferindo protecção e estabilidade aos telómeros (Baumann e

Cech, 2001). Há ainda a ligação do heterodímero Ku, composto por Ku70 e Ku80, e do complexo MRN aos telómeros. Estas proteínas de resposta a dano do DNA são recrutadas para telómeros funcionais durante a replicação, onde cooperam com proteínas dos telómeros de forma a assegurar o correcto processamento da projecção 3' e uma apropriada regulação do tamanho dos telómeros (Verdun e Karlseder, 2007).

A organização dos telómeros é muito semelhante entre leveduras de fissão e mamíferos. Em células de mamíferos, os telómeros estão protegidos por um complexo de seis proteínas, TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1, denominado *shelterin* (de Lange, 2005). Há o recrutamento de três proteínas de ligação específica ao DNA telomérico: TRF1 e TRF2, ortólogos de Taz1, ligam-se à região de dupla cadeia, enquanto a ligação de POT1 ocorre na zona de DNA de cadeia simples. A proteína TPP1 forma um heterodímero com POT1. Esta interacção aumenta a afinidade de POT1 ao substrato (Wang et al., 2007; Xin et al., 2007). TPP1 parece ter também um papel essencial na correcta associação do complexo *shelterin*. A ligação de TPP1 e POT1 a TRF1 e TRF2 realiza-se através da interacção de TPP1 com TIN2 (Kim et al., 2004; Liu et al., 2004).

### 1.1.2 A proteína Pot1

A projecção 3' do DNA telomérico de cadeia simples encontra-se evolutivamente conservada, sendo substrato para a ligação das proteínas TEBP $\alpha$  e TEBP $\beta$  no ciliado *Oxytrichia nova* (Price e Cech, 1987), Cdc13p de *Saccharomyces cerevisiae* (Garvik et al., 1995; Chandra et al., 2001), e de Pot1 (*'protection of telomeres'*) (Baumann e Cech, 2001). Pot1 foi primeiramente identificada em *S. pombe* e encontra-se presente em diversos organismos, incluindo plantas (Shakirov et al., 2005; Wu et al., 2006), galinhas (Wei e Price, 2004), ratinhos e humanos (Baumann e Cech, 2001). Esta proteína liga-se à região de DNA de cadeia simples dos telómeros através de motivos de ligação oligossacarídicos/oligonucleotídicos (*OB folds*), domínios de ligação ao DNA evolutivamente conservados, resultando numa ligação com alta especificidade e afinidade (Mitton-Fry et al., 2002; Lei et al., 2003). Vários organismos possuem mais do que um gene *pot1*, tal como o genoma de ratinhos ou *Tetrahymena*, onde se encontram os genes *pot1a* e *pot1b* (Hockemeyer et al., 2006; Jacob et al., 2007).

Em humanos e ratinhos, além de POT1 se ligar directamente ao DNA telomérico, pode também interagir com TPP1 através do domínio C-terminal. Este complexo interage com TIN2, que por sua vez pode interagir com TRF1 ou TRF2/Rap1. Desta forma, ocorre

também ligação de POT1 à região de dupla cadeia dos telómeros. (Kim et al., 2004). Em *S. pombe*, existem por enquanto apenas evidências da ligação de Pot1 à cadeia simples de DNA telomérico.

A remoção de Pot1 em *S. pombe* resulta numa rápida perda de DNA telomérico, fusões das extremidades dos cromossomas e defeitos na segregação (Baumann e Cech, 2001). Embora ocorra a morte da maioria das células *pot1<sup>-</sup>*, há o aparecimento de alguns sobreviventes, nos quais ocorreu circularização dos três cromossomas, eliminando desta forma a necessidade de manutenção das extremidades dos cromossomas. Como *S. pombe* tem apenas três cromossomas é o único organismo em que se obtêm sobreviventes desta forma.

A remoção de Pot1 nos vertebrados tem um efeito menor na integridade dos telómeros (Churikov et al., 2006; Wu et al., 2006). A disrupção de Pot1a e Pot1b promove a associação de factores de dano do DNA nas extremidades do cromossoma, indicativo de que as células deixam de ser capazes de fazer a distinção entre telómeros e sítios de quebra do DNA. A ausência destas duas proteínas também afecta a proliferação celular, induz endorreplacação e leva á activação das vias de reparação de DNA nos telómeros. Contudo, Pot1a e Pot1b apresentam funções distintas (Hockemeyer et al., 2006). Pot1a, mas não Pot1b, é necessário à prevenção de vias de sinalização de dano do DNA. Pelo contrário, Pot1b, mas não Pot1a, limita a formação da cadeia simples de DNA na projecção 3'. Assim, vários estudos sugerem que a proteína Pot1 apresenta um papel importante na regulação do tamanho dos telómeros. Para além disso, a ligação de Pot1 torna as extremidades dos cromossomas inacessíveis a nucleases, prevenindo desta forma a degradação, e inacessíveis à telomerase, evitando uma extensão em demasia das extremidades. Além disto, evita ainda a ocorrência de fusões entre as extremidades dos cromossomas, consistente com um papel de protecção dos telómeros (Kelleher et al., 2005; Trujillo et al., 2005).

### 1.1.3 Replicação dos telómeros e telomerase

Como os telómeros apresentam uma projecção de cadeia simples, a cadeia que contém a extremidade 5' recuada não pode funcionar como molde para a síntese da cadeia 3' projectada (Lingner et al., 1995). Desta forma, na ausência de mecanismos de manutenção dos telómeros, os cromossomas lineares encolhem progressivamente em cada ronda de replicação do DNA. Além disso, o processamento nucleolítico das extremidades dos telómeros pode também contribuir para o encurtamento dos telómeros (Jacob et al., 2003; Wellinger et al., 1995). Assim, o comprimento dos telómeros é mantido através de um processo dinâmico de

aumento e encurtamento da cadeia de DNA (Hug e Lingner, 2006). O aumento do comprimento dos telómeros é efectuado fundamentalmente pela acção de uma transcriptase reversa especializada denominada telomerase, cuja base consiste numa subunidade proteica catalítica e uma subunidade de RNA (Greider e Blackburn, 1985, 1987, 1989; Lingner et al. 1997). A telomerase aumenta os telómeros através de uma transcrição reversa repetitiva de uma pequena sequência, usando a subunidade de RNA como molde. A subunidade proteica catalítica TERT (*telomerase reverse transcriptase*) é filogeneticamente conservada entre os eucariotas (Nakamura e Cech, 1998; O'Reilly et al., 1999). Em *S. pombe*, a subunidade TERT é codificada pelo gene *trt1*<sup>+</sup>. Em células desprovidas de telomerase ocorre o encurtamento dos telómeros em cada divisão celular, o que conduz a instabilidade cromossómica e senescência celular (Lundblad e Szostak, 1989; Harley et al., 1990; Yu et al. 1990). Em raros casos, algumas células podem emergir da senescência, continuando a dividir-se indefinidamente, usando mecanismos alternativos de manutenção dos telómeros. Esta manutenção, designada de ALT (*alternative lengthening of telomeres*), é independente da telomerase, ocorrendo em células humanas cancerígenas, e também em leveduras privadas de telomerase (Lundblad & Blackburn, 1993). Contudo, em *S. pombe* o acontecimento mais comum é a circularização dos três cromossomas.

A proteína de replicação A (RPA) é uma proteína heterotrimérica, que se liga às regiões de cadeia simples do DNA. RPA é uma proteína conservada entre os eucariotas, sendo necessária para a replicação do DNA, recombinação e reparação, e também para as vias de sinalização despoletadas por DNA danificado (Zou e Elledge, 2003). Verificou-se que RPA se liga transientemente aos telómeros na fase S e que actua na via da telomerase, de forma a permitir a ocorrência da replicação (Schramke et al., 2004).

A expressão da telomerase é necessária na maioria das células para a proliferação ilimitada de organismos unicelulares, como as leveduras. Nos organismos multicelulares, as células somáticas não apresentam telomerase, contrariamente às células estaminais e germinativas. Contudo, em 85-90% de tumores humanos e em células imortalizadas ocorre activação da telomerase (Harley et al., 1994).

## **1.2 Ciclo celular e activação de *checkpoints* em *S. pombe***

O ciclo celular encontra-se dividido em fase de síntese de DNA (S) e fase mitótica (M), separadas por duas fases de intervalo (G1 e G2). Em *S. pombe*, a fase G2 ocupa aproximadamente 70% do ciclo celular. A progressão orquestrada do ciclo celular culmina

eventualmente na geração de duas células filhas idênticas a partir de uma célula parental, através de um processo denominado fissão, que consiste na divisão de uma célula em duas células-filha. Ao longo do ciclo celular existe uma monitorização do estado do DNA, de forma a garantir a fiel e completa replicação do DNA e a estável herança do genoma. Este processo é denominado *checkpoint*.

Em resposta a dano do DNA, ocorre uma paragem do ciclo celular pela inactivação de cinases dependente de ciclinas, os reguladores chave da progressão do ciclo celular (Weinert et al., 1988; O'connell et al., 2000). Em *S. pombe*, há ocorrência de *checkpoints* de dano do DNA na fase S, em resposta a problemas durante a replicação, e uma paragem na transição da fase G2 para M (Al-khoidary e Carr, 1992). Esta paragem do ciclo celular fornece tempo às células, para que possam executar a reparação do DNA, permitindo manter a estabilidade genómica e a viabilidade celular (Hartwell e Weinert, 1989; Elledge, 1996). Um terceiro sistema de *checkpoint*, o *checkpoint* do fuso, resulta no atraso da anafase. Apenas quando todos os cromossomas se encontram correctamente capturados pelo fuso e alinhados na placa metafásica é que ocorre o prosseguimento do ciclo celular, assegurando assim uma correcta segregação cromossómica (Gardner e Burke, 2000; Hardwick, 1998).

A importância da resposta de *checkpoint* na manutenção da estabilidade genómica é enfatizada pela conservação evolucionária destes mecanismos, uma vez que foram identificados vários homólogos dos genes envolvidos nas vias de *checkpoint* das leveduras nos mamíferos. Em *S. pombe*, a proteína Rad3 (ortóloga de ATR) é uma das seis proteínas 'Rad' de *checkpoint*, sendo necessária para ambos os *checkpoints*, o de replicação e o de dano do DNA (Bentley et al., 1996). Contudo, estas duas vias podem ser diferenciadas pela dependência de diferentes cinases. A cinase Chk1, é essencial na paragem mitótica, sendo fosforilada por Rad3 em resposta ao dano do DNA (Walworth e Bernards, 1996). Durante a fase S, a cinase Cds1 é activada em resposta a dano do DNA, concomitantemente com um bloqueio na replicação (Lindsay et al., 1998). Para além de Rad3, a resposta de ambas as cinases, Chk1 e Cds1, necessita de cinco outras proteínas 'Rad': Rad1, Rad9, Rad17, Rad26 e Hus1 (Figura 2 em anexo). As proteínas Rad9-Hus1-Rad1 formam um complexo denominado 9-1-1 (Al-Khodairy et al., 1994; Ford et al., 1994). As células de *S. pombe* apresentam ainda outra proteína cinase, homóloga de ATM em mamíferos, denominada Tel1. Em mamíferos, a proteína cinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) é um regulador essencial da resposta de dano do DNA nas células. Contudo, embora a proteína Tel1 se encontre envolvida na manutenção da integridade dos telómeros, mutantes *tel1*<sup>-</sup> não apresentam quaisquer alterações relacionadas com *checkpoints* (Naito et al., 1998).



### 1.3 Telómeros vs quebras de dano do DNA

As extremidades dos cromossomas lineares são muito semelhantes a quebras na cadeia dupla de DNA. Contudo, embora as células tenham a capacidade de detectar uma única quebra na região de cadeia dupla gerada por dano do DNA (Sandell e Zakian 1993), as extremidades cromossómicas são reconhecidas como estruturas não danosas. De forma a conservar a estabilidade genómica, os telómeros desenvolveram a propriedade de serem refractários aos processos de reparação do DNA.

Tal como nos humanos, a ideia dos telómeros disfuncionais serem tratados como normais quebras do DNA é suportada não só pelo facto de activarem mecanismos de reparação do DNA, mas também pelo facto de ocorrer o aparecimento de *foci* de DNA danificado, onde se observa o recrutamento de proteínas como Rad22 e Rad11 (subunidade maior de RPA) (Takai et al., 2003). No caso da diferenciação dos telómeros ficar comprometida, podem ocorrer fusões entre as extremidades dos cromossomas, o que pode resultar num ciclo de quebras e fusões.

#### 1.3.1 Recombinação homóloga e Fusão de extremidades não homólogas (NHEJ)

A reparação eficiente das quebras do DNA de dupla cadeia é essencial para a manutenção da estabilidade genómica em todos os organismos. Os dois principais mecanismos de reparação são a recombinação homóloga (HR) e a fusão de extremidades não homólogas (NHEJ) (Wyman e Kanaar, 2006).

A recombinação homóloga é um mecanismo de reparação que usa sequências de DNA homólogas como molde, normalmente o cromátídeo irmão, para a reparação das extremidades em que houve perda de informação. Desta forma, promove uma reparação do DNA livre de erros (West, 2003). Este mecanismo de reparação requer a presença de várias proteínas, tais como Rad32, Rad50 e Nbs1, que formam o complexo MRN, e ainda as proteínas Rhp51, Rad22, Rhp55, Rhp54 e Mus81. Predominantemente, a recombinação homóloga encontra-se activa durante as fases S e G2 do ciclo celular, altura em que se encontra disponível o cromátídeo irmão para servir de molde (Ferreira e Cooper, 2004).

Na fusão de extremidades não homólogas, as duas extremidades de DNA danificado são simplesmente unidas, sendo por isso um mecanismo sujeito à ocorrência de erros, uma vez que o evento de dano ou o subsequente processamento pode resultar na perda de nucleótidos numa, ou em ambas as extremidades (Burma et al., 2006). As proteínas

heterodiméricas de ligação ao DNA Ku70/Ku80 e a ligase IV do DNA são as proteínas chave para a ocorrência de NHEJ (Jackson, 2002). O heterodímero Ku70/80 é necessário para um NHEJ correcto e eficiente, protegendo as extremidades de DNA de digestão exonucleolítica (Getts e Stamato, 1994). Em mamíferos, existe ainda a proteína XRCC4, que dimeriza com a ligase IV do DNA. Esta via de reparação encontra-se activa ao longo de todo o ciclo celular, embora seja a via dominante na fase G1, quando não existe disponível o cromátídeo irmão como molde para a recombinação homóloga (Ferreira e Cooper, 2004).

Surpreendentemente, várias proteínas com funções na reparação de DNA estão também envolvidas na manutenção dos telómeros. O heterodímero Ku, o complexo Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), ATM, e outras proteínas descritas como sensores de dano, proteínas de checkpoint e factores de reparação parecem estar também implicados na normal função dos telómeros (d'Adda di Fagagna et al., 2004).

### **1.3.2 Ciclo de quebra-fusão-ponte**

Quando a estrutura telomérica fica comprometida, podem-se iniciar eventos de fusão entre cromossomas. Aquando da entrada em mitose, o centrómero de cada cromátídeo é puxado em direcções opostas pelo fuso mitótico, criando uma estrutura denominada 'ponte anafásica'. No caso de terem ocorrido fusões de cromossomas, são criados cromossomas com dois centrómeros, designados por cromossomas dicêntricos. Aquando da anafase seguinte, a maquinaria mitótica leva à separação dos dois cromátídeos, provocando a quebra do DNA num sítio aleatório entre os dois centrómeros. Deste evento resultam duas novas extremidades cromossómicas, sendo que nenhuma delas apresenta telómeros. Como tal, pode ocorrer novamente a fusão entre as duas extremidades desprotegidas, iniciando-se um novo ciclo de quebra do cromossoma. Esta sequência de eventos é portanto denominada de ciclo de quebra-fusão-ponte, uma vez que envolve uma inicial quebra do cromossoma dicêntrico durante a anafase, a subsequente fusão do DNA não telomérico resultante com outra extremidade desprotegida, e a formação novamente da ponte anafásica entre os novos cromossomas dicêntricos resultante da fusão. Este tipo de instabilidade genómica foi detectado em várias linhas celulares cancerígenas, e pensa-se que pode promover uma progressão até à malignidade celular (de Lange, 2005).

Torna-se assim de extrema importância compreender os mecanismos que distinguem os telómeros de quebras no DNA induzidas por dano, e por consequência que os protegem da activação das vias de reparação do DNA e da activação das vias de *checkpoints* de danos do

DNA. A dissecação destes mecanismos constitui um avanço importante na compreensão de patologias cancerígenas, permitindo desvendar os passos iniciais do processo de tumorigénese.

## Tese

Neste estudo, pretende-se identificar o mecanismo que protege os telómeros de serem reconhecidos como DNA danificado, utilizando como modelo a levedura de fissão *S. pombe*. Sabemos que na ausência da proteína Taz1 os telómeros são expostos a processos de reparação que actuam nas quebras de DNA. No entanto, os *checkpoints* de dano do DNA permanecem ausentes em *taz1<sup>-</sup>*. Como tal, propomos que os telómeros apresentam funções separadas na prevenção dos *checkpoints* e na reparação de DNA nas extremidades dos cromossomas, sendo o nosso candidato como proteína de anti-checkpoint a proteína Pot1.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a remoção de Pot1 de um telómero *taz1<sup>-</sup>* promove o alongamento celular e a fosforilação de Chk1 – sinais da activação de *checkpoint*. Para além disso, o fenótipo normal é recuperado aquando da deleção de *rad3<sup>-</sup>*, a cinase de *checkpoint* da via ATR nas células de fissão. Estes resultados indicam que Pot1 é o componente chave na prevenção da activação dos *checkpoints* de dano do DNA nos telómeros.

A fácil manipulação genética e a semelhança da organização e dinâmica cromossomais de *S. pombe* com eucariotas superiores tornam este organismo num bom modelo de estudo da biologia dos telómeros.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Estirpes de *S. pombe* e meios de cultura

O meio rico YES (0.5% (p/v) extracto de levedura, 3.0% (p/v) glucose, suplementado com 225mg/L de adenina, histidina, leucina e uracilo) e o meio mínimo (EMM; hidrogenoftalato de potássio 14.7mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15.5mM, 2% (p/v) glucose, sais 20ml/l, vitaminas 1ml/l, minerais 0.1ml/l), suplementado com diversos aminoácidos (225mg/L de adenina, histidina, leucina e uracilo) e uma fonte de azoto (NH<sub>4</sub>Cl 93.5 mM), foram usados para crescer as diferentes estirpes de *S. pombe* usadas neste estudo, tal como descrito em *Moreno et al.* (1991). Os meios sólidos, para placas, derivam dos meios líquidos pela adição de 10g/L de bacto agar (Difco).

As estirpes de *S. pombe* usadas neste estudo estão listadas na Tabela I.

**Tabela I.** Estirpes de *Schizosaccharomyces pombe* usadas neste estudo

Estirpe	Genótipo	Referência
<i>Estirpe selvagem</i>	ade6-M210/M216 his3-D1-/- leu1-32-/- ura4-D18-/-	J.P.Cooper
<i>pot1<sup>+/+</sup></i>	ade6-M210/M216 his3-D1-/- leu1-32-/- ura4-D18-/- pot1+/pot1::ura4	Este estudo
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup></i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/-	J.P.Cooper
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>pot1<sup>+/+</sup></i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/- pot1+/pot1::hph	Este estudo
<i>rad3<sup>+/+</sup></i>	ade6-M210/M216 his3-D1-/- leu1-32-/- ura4-D18-/- rad3+/rad3::nat	Este estudo
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>rad3<sup>+/+</sup></i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/- rad3+/rad3::nat	Este estudo
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>pot1<sup>+/+</sup>rad3<sup>+/+</sup></i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/- pot1+/pot1::hph rad3+/rad3::nat	Este estudo
<i>wt Chk1-myc</i>	ade6-M210/M216 his3-D1-/- leu1-32-/- ura4-D18-/-chk1+/chk1-13myc (Osman et al)	Este estudo
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>Chk1-myc</i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/-chk1+/chk1-13myc (Osman et al)	Este estudo
<i>taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>pot1<sup>+/+</sup>Chk1-myc</i>	ade6-M210/M216 leu1-32-/- ura4-D18-/- lig4-/- taz1-/- pot1+/pot1::hph chk1+/chk1-13myc (nat)	Este estudo

### 2.2 Construção das estirpes de *S. pombe*

A construção das estirpes de *S. pombe* foi efectuada com base no método de PCR publicado em *Bahler et al* (1998). Resumidamente, os fragmentos de DNA a serem utilizados

para fazer a disrupção ou marcação de um determinado gene foram amplificados pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) e introduzidos nas estirpes de *S. pombe* pelo método de transformação com acetato de lítio (Keeney e Boeke, 1994).

### 2.2.1 Amplificação de DNA através da reacção de polimerização em cadeia (PCR)

As reacções de PCR foram realizadas num volume final de 50µl (contendo 8ng/µl de cada *primer*, 1x tampão de PCR, 2,5mM dCTP, 2,5mM dGTP, 2,5mM dATP, 2,5mM dTTP, 5.0U Taq DNA polimerase (Fermentas)) e usando DNA plasmídico, DNA genómico ou produtos de um PCR anterior como molde. Dependendo da estirpe a ser construída, foram usados diferentes conjuntos de primers (ver tabela II):

- Par 1, para amplificar o fragmento *pot1::higromicina*, usando como molde o plasmídeo pFA6a hph. Este fragmento foi usado para disrupção do gene *Pot1* conferindo à estirpe resistência ao antibiótico higromicina B (Wood et al).

- Par 2, usado para amplificar o fragmento *pot1::ura4* tendo como molde o mesmo fragmento derivado de um PCR anterior. Este fragmento foi utilizado para fazer a disrupção do gene *Pot1*, conferindo à estirpe a possibilidade de crescer em meio mínimo sem uracilo.

- Par 7, que usando como molde o plasmídeo pFA6a nat permitiu amplificar o fragmento *rad3::nat*, possibilitando a disrupção do gene *Rad3* conferindo resistência a nurseotricina (CloNAT).

- Par 4, permitindo a amplificação do fragmento *chk1-myc* possibilitou a construção de uma fusão entre a parte C-terminal do gene endógeno *chk1* com o gene que codifica o epítipo *myc*. Como DNA molde foi utilizado o plasmídeo PFA6a-13myc-nat.

As reacções de PCR foram efectuadas num termociclador (MJ Research Inc, PTC100), sendo sujeitas a diferentes condições consoante o tipo de *primers* utilizados. Aquando da utilização dos pares 2 e 7, o DNA molde foi desnaturado a 95°C por 5min, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo em: amplificação a 95°C por 30seg, annealing dos *primers* a 50°C por 1min, extensão das novas cadeias de DNA a 72°C (1min por cada kb), seguido de um passo de extensão final a 72°C por 10min. No caso de *primers* degenerados (pares 1, 4 e 7; ver tabela II), o DNA molde foi desnaturado primeiramente a 95°C por 5min, seguido de 5 ciclos, consistindo cada ciclo em: amplificação a 95°C por 1min, annealing dos *primers* a 45°C por 2min, extensão das novas cadeias de DNA a 72°C (1min por cada kb). Após os primeiros 5 ciclos iniciais, seguiram-se 35 ciclos, consistindo cada ciclo em: amplificação a

95°C por 30seg, annealing dos *primers* a 55°C por 30seg, extensão das novas cadeias de DNA a 72°C (1min por cada kb), seguido de um passo de extensão final a 72°C por 10min.

Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose para confirmar se o tamanho dos fragmentos era o esperado.

**Tabela II.** Pares de *primers* usados neste estudo

	<i>Primer</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>
1	<i>Pot11 KO 5'</i>	CAATTCCATTTAGGTTTCTGAGAAAGGCTAAACTCATTTGTTGTTCTTAAAGGATATTTGGATCATT CGTTGATCAAGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA
	<i>Pot11 KO 3'</i>	TTTCCTTAAATTTAAATATTGTTTTCTTATGTTTCTTTCCGTAAGCATTTCATTATTGTAAGTTTTGT ATCACAATAGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
2	<i>Pot F</i>	TTGGCATGAACCGGTATGCG
	<i>Pot R</i>	CCTACCGAGAATAACCGTCG
3	<i>Pot1(-650) F</i>	AAACGCATAGAGCAGGTTGG
	<i>Pot1652 R</i>	GCTTATGCTTCGATTGTCGC
4	<i>chk1 3'Tag Rev</i>	TCATTTGTACTACCACAAAATTGAAAATAAATTCACAACGAAGTCAAACAACAGGTTTCTTTACAAA CGAACTGGCAGACCTTTCAAAGATGTGCAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
	<i>chk1 3'Tag For no stop</i>	AGTATGTCTTTATCATAGGGATTTCATATACTAATCCATGTGAAAGAACGTTGTCAAGTCAATAGGGAA GCCGATTGTTCTTACAGATGTTTCACAAAATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
5	<i>chk1 1424 F</i>	GCGTCGAGAGAAACCATTAT
	<i>chk1 UTR R</i>	CGAATCCACGACTTTAAGTG
6	<i>pFA6a Term F</i>	GTTTAAACGAGCTCGAATTC
	<i>chk1 UTR R</i>	CGAATCCACGACTTTAAGTG
7	<i>rad3 KO F</i>	CTTTTAAACATGATGATTCAAAATCTGAATTTATCTCTCCTAAGATGCTAAAAGAAGCCCATCTCTCTC TACAAGCGTTACGGATCCCCGGGTTAATTAA
	<i>rad3 KO R</i>	TAATAAATAAAATATCTTCGATTCAAATCATAAGTTTAATAATGGGTAGCTTGTTTCATTGAAATTTTTG TTAGTAAATGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
8	<i>rad3 6219F</i>	GGATGGCAACTTATACCCAT
	<i>rad3 Utr R</i>	GGTGGAAATGATGGTGAAAG
9	<i>pFA6a Term R</i>	GTTTAAACGAGCTCGAATTC
	<i>rad3 Utr R</i>	GGTGGAAATGATGGTGAAAG
10	<i>MT1</i>	AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG
	<i>MP</i>	TACGTTCACTAGACGTAGTG
	<i>MM</i>	ACGGTAGTCATCGGTCTTCC

### 2.2.2 Transformação de células de *S. pombe*

A disrupção dos genes nas diferentes estirpes foi efectuada utilizando o método de acetato de lítio, tal como descrito em *Keeney e Boeke* (1994). As células diplóides cresceram em meio mínimo sem adenina até atingirem uma concentração aproximada de  $10^7$  células/ml. O *pellet* (3.000rpm, 3min) de 25 ml da cultura foi lavado numa solução 0,1M de acetato de lítio, 10mM de Tris pH=7,5 e 1mM EDTA (LiAc-TE) e ressuspendido em 500µl de LiAc-TE. A 100µl desta suspensão celular adicionou-se 10µl de DNA de esperma de salmão sonificado (10mg/ml) e 10µl de uma reacção de PCR contendo o fragmento apropriado (ver acima). Após 5min de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 280µl de LiAc-TE contendo 40% de PEG. Procedeu-se novamente a um período de incubação a 32°C durante 1h, após o qual foi feito dado o choque térmico a 42°C durante 7min. O *pellet* (13.200rpm, 3seg) foi lavado em meio mínimo sem qualquer aminoácido ou azoto e ressuspendido em 5ml de meio rico. Esta cultura celular foi sujeita a uma incubação a 32°C durante a noite com agitação. Após o período de incubação, o *pellet* (13.200rpm, 3seg) foi lavado e ressuspendido em 150µl de meio mínimo que foram de seguida plaqueados em meio selectivo apropriado e incubados a 32°C até ao aparecimento de colónias.

### 2.2.3 Confirmação da transformação e estado de ploidia das estirpes

Para confirmar se o fragmento introduzido foi integrado no local genómico correcto, os transformantes obtidos foram analisados por PCR, usando *primers* para o fragmento introduzido e para as sequências genómicas flanqueadoras, ou usando *primers* apenas nas sequências genómicas flanqueadoras, sujeitando, neste último caso, o fragmento amplificado a restrição com enzimas apropriadas. A confirmação da disrupção do gene *pot1* foi realizada usando o par de *primers* 3 (ver tabela II). Dado que as estirpes criadas são diplóides heterozigóticas em relação ao gene modificado, o emparelhamento destes *primers* nas sequências flanqueadoras do gene *pot1*, resulta na amplificação de dois fragmentos, um contendo as sequências flanqueadoras e o gene *pot1* e o outro contendo as sequências flanqueadoras e o fragmento *pot1::higromicina* (ou *pot1::ura4* consoante a estirpe diplóide transformada). Estes fragmentos foram depois sujeitos a restrição com as enzimas *Apal* (NEB) e *NdeI* (fermentas), ou *BsaI* (NEB) e *XhoI* (Fermentas), com o objectivo de diferenciar os dois fragmentos amplificados, dado que são os dois do mesmo tamanho. Para confirmação da fusão ente o gene *chk1* endógeno e o epítipo myc foram usados os conjuntos de *primers* 5 e 6 (ver tabela II). Para confirmar a disrupção do gene *rad3* utilizaram-se os pares de *primers*

8 e 9 (ver tabela II). Ambos os pares de *primers* emparelham no fragmento introduzido e na sequência genómica flanqueadora.

A confirmação da diploidia das estirpes foi realizada usando o conjunto de *primers* 10 (ver tabela II), que resulta na amplificação de duas bandas de tamanhos diferentes correspondentes ao tipo de conjugação  $h^+$  e  $h^-$ .

### 2.3 Esporulação das estirpes de *S. pombe*

As estirpes diplóides de *S. pombe*, que estavam congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , foram espalhadas em placas de meio mínimo completo e incubadas a  $32^{\circ}\text{C}$ . Após 3 dias, os ascos foram recolhidos e ressuspensos em 1ml de água com 10 $\mu\text{l}$  de ‘snail-juice’ (Pall Life Sciences), sendo depois sujeitos a uma incubação durante a noite a  $32^{\circ}\text{C}$  com agitação, de forma a libertar os esporos do asco.

### 2.4 Germinação e selecção dos esporos

A germinação dos esporos das diferentes estirpes foi efectuada em 5ml de YES com ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$ ) a  $32^{\circ}\text{C}$  com agitação, durante um período de 7h. Após este período, correspondente ao início da germinação (mas anterior à primeira divisão do espora), foi recolhido o *pellet* das culturas (4.000rpm, 10min), ressuspensionado em 23 ml de meio selectivo e colocado a  $32^{\circ}\text{C}$  com agitação.

O meio selectivo variou consoante as estirpes em estudo. No caso da selecção dos esporos na estirpe *pot1*<sup>+/-</sup> foi efectuada selecção de esporos *pot1*<sup>-</sup> em meio mínimo sem uracilo e contra-selecção de *pot1*<sup>+</sup> em meio mínimo completo com adição de 0,1% de 5FOA (ácido 5-fluororotico). O crescimento da estirpe *taz1*<sup>-/-</sup>*lig4*<sup>-/-</sup> efectuou-se em YES e a selecção de *pot1*<sup>-</sup> na estirpe *taz1*<sup>-/-</sup>*lig4*<sup>-/-</sup>*pot1*<sup>+/-</sup>, realizou-se em meio YES com higromicina (300 $\mu\text{g/ml}$ ). Para as restantes estirpes com disrupção do gene *rad3*<sup>+</sup> ou com o epítipo myc, foi utilizado meio YES com clonat (100 $\mu\text{g/ml}$ ), no caso de serem *pot1*<sup>+</sup>, ou YES com higromicina (300 $\mu\text{g/ml}$ ) e clonat (100 $\mu\text{g/ml}$ ), no caso de serem *pot1*<sup>-</sup>. Em todos os casos adicionou-se ainda ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$ ) de forma a evitar ocorrência de contaminações bacterianas provenientes da incubação com ‘snail-juice’.

### 2.5 Recolha de amostras após germinação dos esporos

A recolha das amostras foi efectuada de 3h em 3h até às 12h, e novamente às 24h, correspondendo o tempo 0h à passagem dos esporos para meio selectivo. Em cada recolha,



efectuou-se a centrifugação (13.200rpm, 5min) de 4ml de amostra. As células foram ressuspensas em 1ml de tampão SP1 (50mM citrato/fosfato pH 5.6, 0.2M sorbitol) com adição de 0,1% azida de sódio. Retirou-se 300µl desta suspensão de células e adicionou-se 700µl de etanol a 70%, sendo esta amostra guardada a 4°C para posterior análise microscópica. Ao restante volume da cultura (700µl) foi efectuada nova centrifugação (13.200rpm, 5min), e o *pellet* resultante foi congelado a -80°C para posterior processamento da amostra para análise por Western Blot.

## 2.6 Análise Microscópica

### 2.6.1 Aquisição de imagens

Para análise microscópica, as células foram sujeitas a uma coloração específica para o DNA (0,1µg/mL de DAPI) e para os septos (1mg/mL de calcofluor). As imagens de microscopia foram obtidas usando um microscópio invertido Leica DMRA2 equipado com uma camera digital Hamamatsu.

### 2.6.2 Medição das células

A medição das células foi realizada nas imagens de microscopia recolhidas, recorrendo ao *software* de imagem ImageJ. Para cada tempo em que se recolheram amostras, foram efectuadas medições de 100 células. Os valores obtidos permitiram desenhar histogramas representando o *ratio* entre o número de células e o número total de células medidas (frequência) para um determinado intervalo de comprimento.

## 2.7 Análise Proteica

### 2.7.1 Preparação de extractos proteicos

As proteínas das células recolhidas em cada tempo de amostragem foram isoladas pelo método TCA. Aos *pellets* congelados de cada amostra adicionou-se 200µl de uma solução a 20% (p/v) de ácido tricloroacético (TCA) e 0,3g de *glass beads*. Após 7min no *vortex*, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado (3.000rpm, 10min). O *pellet* resultante foi ressuspendido em tampão Laemmli (Tris HCl 62,5mM pH6,8, 10% (v/v) glicerol, 0,002% azul de bromofenol) contendo 5% de β-mercaptoetanol, adicionando imediatamente 1M Tris até o sobrenadante ficar azul (cor do tampão Laemmli). Seguiu-se um período de incubação a

100°C durante 5min. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (3.000rpm, 10min), sendo o sobrenadante recolhido e aplicado no gel (10µl).

### ***2.7.2 Resolução de proteínas por electroforese em gel de poliacrilamida SDS***

As proteínas foram resolvidas por SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras. Os géis de proteínas (7,5%) foram preparados de forma a obter uma proporção de 100:1 de acrilamida/bis-acrilamida (National Diagnostics) e corridos num sistema vertical de minigéis da Bio-Rad, contendo tampão de corrida (25mM Tris, 250mM glicina, 0,1%v/v SDS, pH 8,3). As amostras foram corridas lado a lado com um marcador de pesos molecular (Kaleidoscope precision plus da Bio-Rad), inicialmente a 100V, passando a voltagem para 150V após atingirem o gel de resolução.

### ***2.7.3 Immunoblot (Western Blot)***

Após a electroforese (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas electroforéticamente para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, Amersham) a 100V durante 1h. A transferência foi feita num sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad) contendo tampão de transferência (48mM Tris, 39mM glicina, 20% v/v metanol, 3,7% SDS). Após a transferência, a membrana foi corada com a solução Ponceau (0.1% p/v de Ponceau diluída 5 vezes em água) de forma a confirmar a eficiência da transferência das proteínas.

De seguida, a membrana foi bloqueada com leite a 5% p/v (leite magro em pó Molico) em TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH=7,5) contendo 0,1% v/v de Tween 20, durante 15min à temperatura ambiente (TA) com agitação.

Após o bloqueio, a membrana foi lavada (todas as lavagens subsequentes foram realizadas com TBS-Tween 0,1% com agitação) e incubada com o anticorpo primário anti-myc (Santa Cruz Biotechnology SC-40) diluído 1:2000 em solução de bloqueio durante a noite a 4°C. Após esse período, a membrana foi sujeita a três lavagens, cada uma durante 5min, e incubada, 1h à TA, com o anticorpo secundário anti-mouse IgG conjugado com a enzima peroxidase de rábano selvagem (HRP; GE Healthcare NA931V), diluído 1:5000 em solução de bloqueio. Depois de lavada, a membrana foi incubada com o reagente de detecção da actividade da HRP (ECL da Amersham) por quimiofluorescência, de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, a membrana foi revelada num *scanner* STORM da Molecular Dynamics.

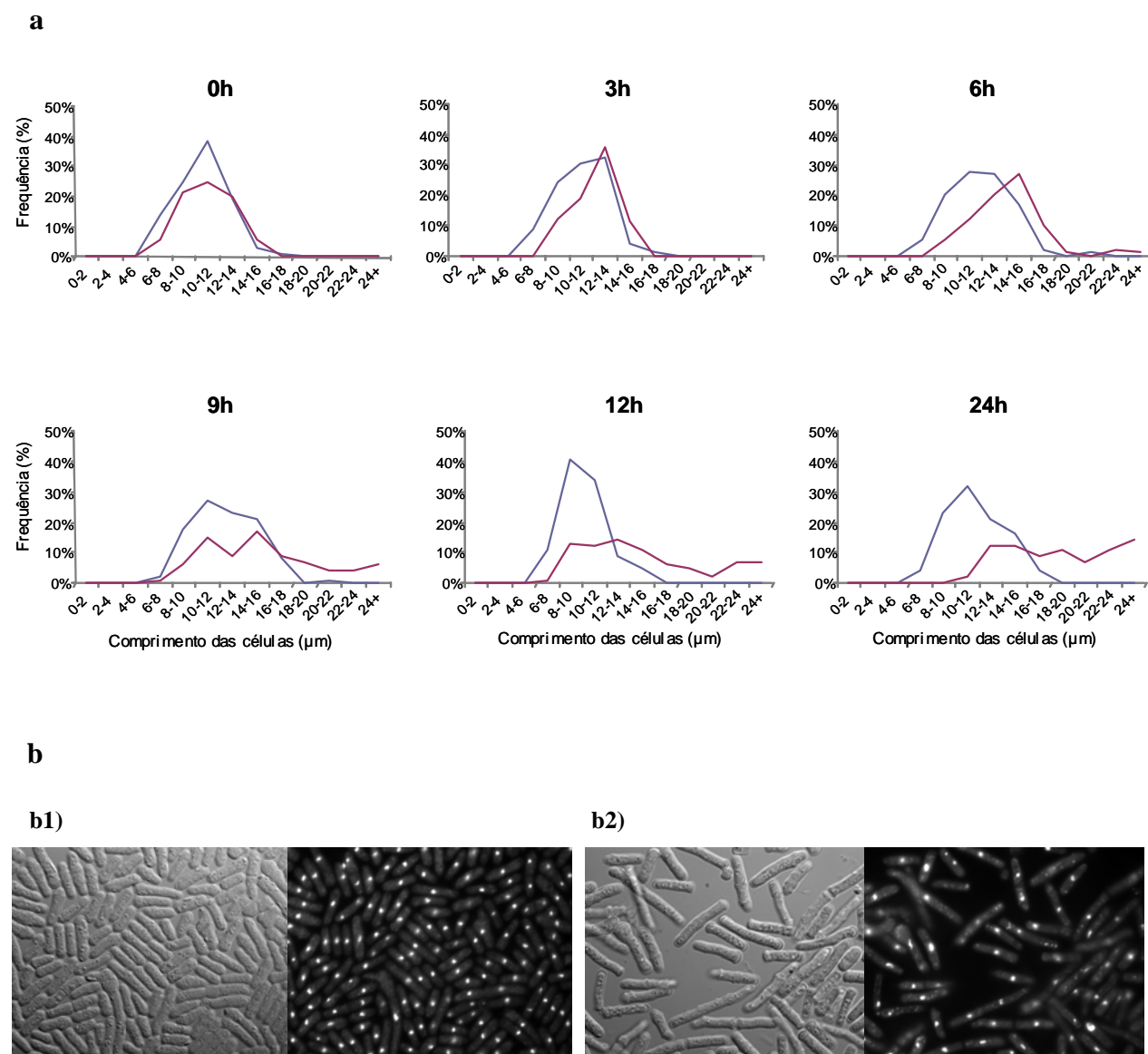
### 3. Resultados

#### 3.1 Remoção de *Pot1* resulta na desprotecção dos telómeros e activação de *checkpoints*

Em *S. pombe*, é na região de dupla cadeia de DNA dos telómeros que ocorre a ligação da proteína Taz1, ortóloga das proteínas humanas TRF1 e TRF2 (Cooper et al., 1997; Li et al., 2000). Verificou-se que na ausência de Taz1, embora sejam activadas as vias de reparação de DNA, comprovado pela localização nos telómeros de proteínas envolvidas na iniciação desta via (RPA, ATRIP e Rad52) (Figura 3 em anexo), os *checkpoints* de dano do DNA não são concretizados, uma vez que não se observa fosforilação de Chk1, proteína repórter que constitui um alvo a juzante deste mecanismo (Miguel G. Ferreira, não publicado; Figura 4 em anexo). Esta ausência de *checkpoint* ocorre embora haja associação de várias proteínas envolvidas na via de *checkpoint* com os telómeros de células *taz1<sup>-</sup>*. Estes resultados sugerem que a activação de *checkpoints* é bloqueada por outro constituinte telomérico. Considerámos a possibilidade de ser a proteína Pot1 a responsável pela inibição de *checkpoints* nos telómeros, uma vez que na ausência de Taz1, Pot1 permanece ligada à região de cadeia simples do DNA telomérico (Baumann e Cech, 2001).

Em *S. pombe* a activação de *checkpoints* de dano do DNA leva a uma paragem das células na fase G2 do ciclo celular. Contudo, embora as células parem a divisão celular, continua a ocorrer crescimento por extensão apical. Como consequência, uma forma de monitorizar a ocorrência de *checkpoints* nas células é a verificação de um alongamento celular. Assim, para determinar o efeito da disrupção de Pot1 na protecção telomérica e na prevenção de *checkpoints*, foi efectuada a disrupção deste gene numa estirpe selvagem e monitorizou-se o crescimento das células de 3h em 3h até às 12h, e depois novamente às 24h (ver Materiais e Métodos). Numa cultura de *S. pombe* a crescer em fase exponencial o tamanho das células distribui-se entre os 7 e os 14µm, ocorrendo divisão celular por fissão quando atingem os 14µm. Observou-se que, após a germinação, ocorre uma distribuição do comprimento celular de ambas as populações, selvagem e *pot1<sup>-</sup>*, maioritariamente entre 8 e 14µm (Figura 1a). Contudo, verificou-se que, enquanto na estirpe selvagem a divisão celular ocorreu normalmente, permanecendo a população final com uma distribuição dos tamanhos celulares entre 6 e 16µm (Figura 1a), na estirpe *pot1<sup>-</sup>* verificou-se um aumento celular

progressivo, chegando algumas células a atingir um tamanho de 26µm. Após 24h, as células *potI*<sup>-</sup> permaneceram bastante alongadas (Figura 1a e b), sugerindo uma paragem na fase G2 do ciclo celular.



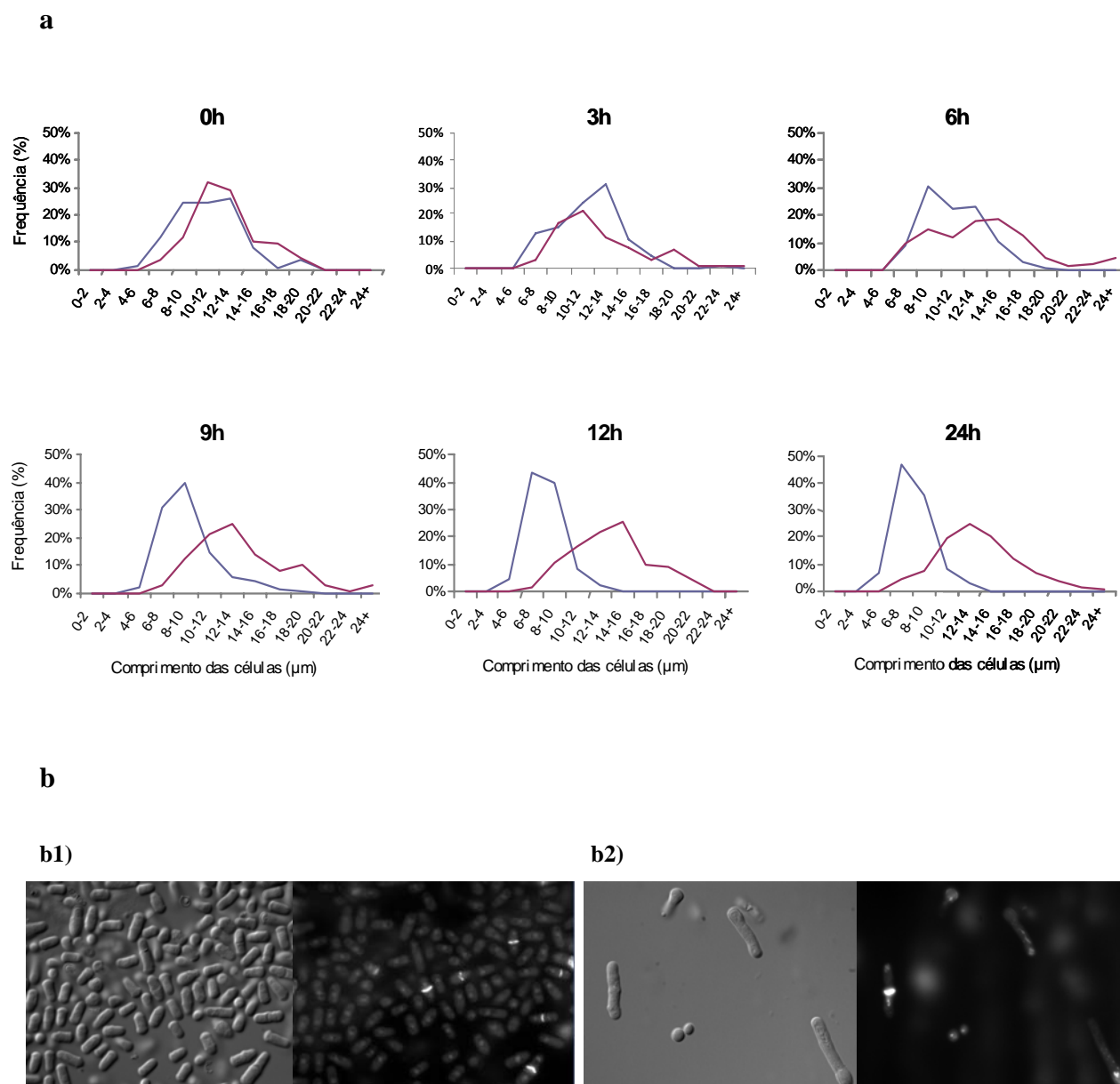
**Figura 1. Remoção de Pot1 provoca alongamento celular.** **a**, Distribuição do comprimento celular (µm), após germinação dos esporos, das estirpes selvagem (—) e *potI*<sup>-</sup> (—), ao longo do tempo. **b**, Células representativas da população *potI*<sup>+</sup> (b1) e *potI*<sup>-</sup> (b2), após 24h em meio selectivo. Em b1 e b2 estão representadas imagens de microscopia de contraste de fase (DIC) (painel da esquerda), e imagens de células com coloração do DNA (com DAPI) e dos septos (com calcofluor) (painel da direita).

Contudo, resultados anteriores mostram que a disrupção do gene *potI*<sup>+</sup> da levedura de fissão tem um efeito imediato na estabilidade cromossómica, originando uma perda rápida do DNA telomérico, fusões das extremidades cromossómicas e defeitos na segregação. Apesar

da grande maioria das células *pot1<sup>-</sup>* morrerem, há o aparecimento de sobreviventes, nos quais ocorre circularização dos três cromossomas (Baumann e Cech, 2001). Desta forma, não é possível saber se o alongamento celular em *pot1<sup>-</sup>* resulta da perda da proteína Pot1, putativamente responsável pela prevenção de *checkpoints* nos telómeros, ou da perda de telómeros, que leva também à activação desta via.

De modo a distinguir entre estas duas possibilidades, foram exploradas as características teloméricas conferidas pela inactivação de *taz1<sup>+</sup>*. Em *S. pombe*, a remoção do gene *taz1<sup>+</sup>* resulta no alongamento das regiões de repetição telomérica da dupla cadeia de DNA e desregulação do tamanho da cadeia projectada 3' (Cooper et al, 1997). Na estirpe *taz1<sup>-</sup>* a remoção de Pot1 não origina perda de telómeros, ocorrendo o aparecimento de sobreviventes com fusões de telómeros (dados não apresentados). Contudo, a perda de Taz1 torna os telómeros vulneráveis a fusões e rearranjos dos cromossomas na fase G1 do ciclo celular, resultando na perda da viabilidade celular (Nakamura e Cech, 1998). Uma forma de contornar este problema é a realização da remoção da proteína ligase IV do DNA (Lig4), essencial na via de NHEJ, evitando desta forma a ocorrência destas fusões aquando da meiose, uma vez que esta é precedida pela fase G1. Assim, de forma a ultrapassar o problema inicial de perda de telómeros, efectuou-se o mesmo ensaio de monitorização do comprimento celular, mas desta vez efectuando a disrupção de Pot1 numa estirpe *taz1<sup>-/-</sup>lig4<sup>-/-</sup>*.

Após a germinação das células, verificou-se que ambas as estirpes, *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>+</sup>* e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>* apresentavam uma distribuição do comprimento celular entre 6 e 16µm (Figura 2a). Tal como para a estirpe selvagem, verificou-se que na estirpe *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>+</sup>* a divisão celular ocorreu normalmente, permanecendo a população final com uma distribuição dos tamanhos celulares entre 4 e 14µm (Figura 2a). Ao fim de 24h, as células continuam a proliferar, comprovado pela presença de inúmeros septos (Figura 2b). Pelo contrário, na ausência de Pot1 verificou-se um progressivo aumento celular com ausência de septação, chegando algumas células a atingir um tamanho de 25µm, permanecendo a população *pot1<sup>-</sup>* bastante alongada ao fim de 24h. (Figura 2a e b). Desta forma, aquando da remoção de Pot1, há ocorrência de alongamento celular, mesmo na presença de telómeros. Estes resultados sugerem uma paragem no ciclo celular, causada pela perda de Pot1, devido à activação da via de checkpoint de reparação do DNA.



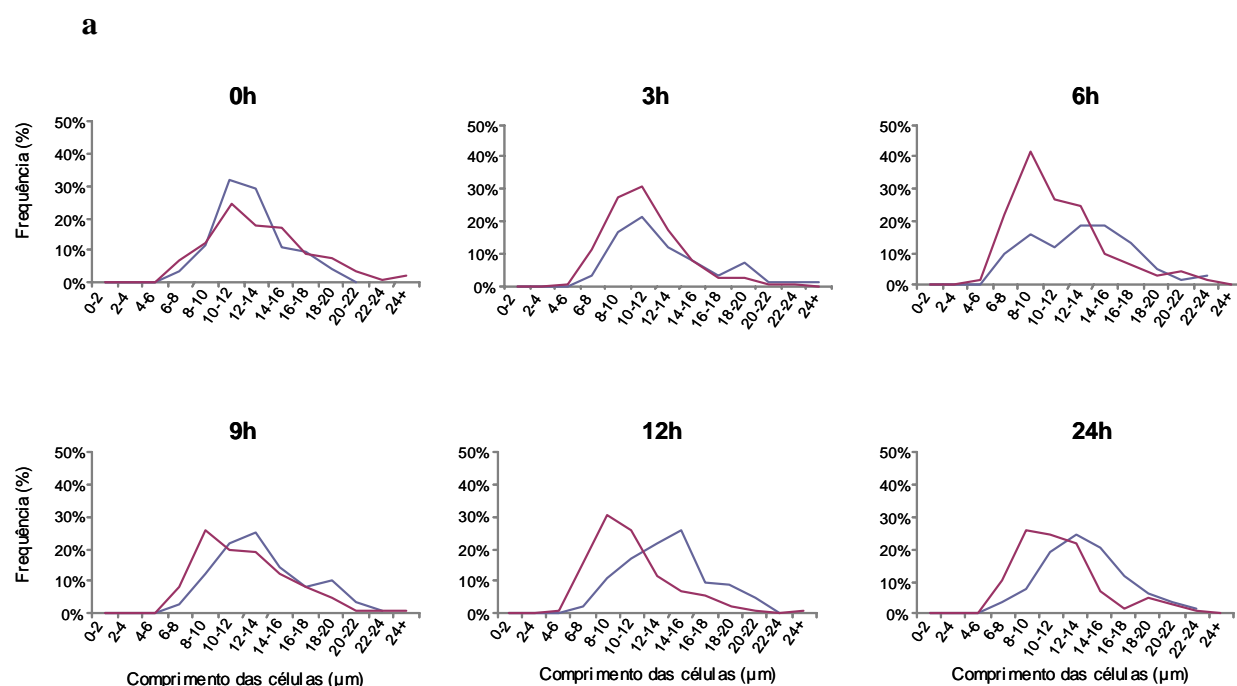
**Figura 2. Remoção de Pot1 provoca alongamento celular em células *taz1*.** **a**, Distribuição do comprimento celular ( $\mu\text{m}$ ), após germinação dos esporos, das estirpes *taz1 lig4* ( — ) e *taz1 lig4 pot1* ( — ), ao longo do tempo. **b**, Células representativas da população *taz1 lig4* (b1) e *taz1 lig4 pot1* (b2), após 24h em meio selectivo. Em b1 e b2 estão representadas imagens de microscopia de contraste de fase (DIC) (painel da esquerda), e imagens de células com coloração do DNA (com DAPI) e dos septos (com calcofluor) (painel da direita).

### 3.2 Os efeitos celulares da inactivação de *Pot1* são mediados por *Rad3/ATR*

Para comprovar que o alongamento celular derivado da remoção de *Pot1* se deve à activação de *checkpoints*, procedeu-se à disrupção da via de *checkpoint* de reparação do DNA (Figura 2 em anexo). Em *S. pombe*, a cinase *Chk1* é essencial na paragem do ciclo celular, sendo fosforilada por *Rad3* após dano do DNA. Durante a fase S, a cinase *Cds1* é também activada em resposta a problemas na replicação do DNA. A resposta de ambas as proteínas, *Chk1* e *Cds1*, necessita de seis outras proteínas: *Rad1*, *Rad3*, *Rad9*, *Rad17*, *Rad26* e *Hus1*

(Al- Khodairy et al., 1994; Ford et al.). Removendo a proteína Rad3, ortóloga de ATR nos mamíferos, as vias de *checkpoint* ficam interrompidas, uma vez que esta proteína constitui o principal sensor de danos de DNA em *S. pombe*. Desta forma, pode ser confirmado se o alongamento celular se deve à activação destas vias na célula.

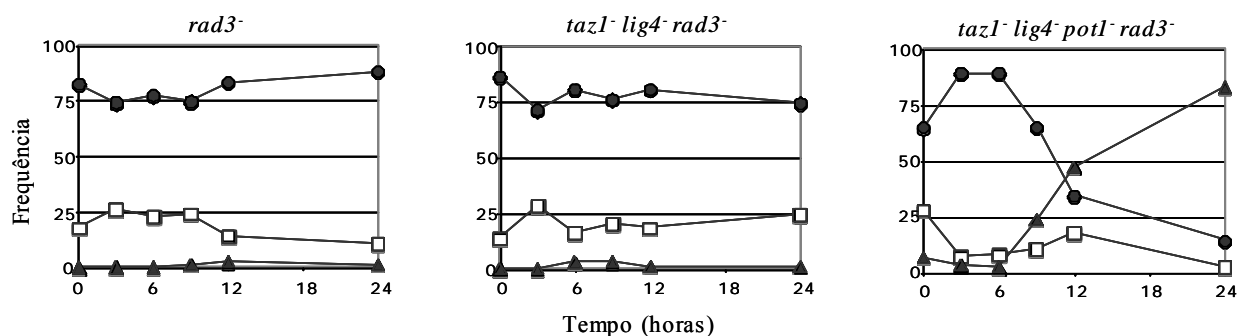
Assim, foi realizado o mesmo ensaio de monitorização de comprimento celular, efectuando-se a remoção de Rad3 numa estirpe *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>*. A remoção da proteína Rad3 não apresenta quaisquer efeitos na divisão celular, comprovado pela normal proliferação das estirpes *rad3<sup>-</sup>* e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>* (Figura 5 em anexo). Verificou-se que na estirpe *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>*, após a germinação, as células apresentavam uma distribuição dos tamanhos, maioritariamente, entre 4 e 20µm (Figura 3a).



**Figura 3. Os efeitos celulares da inactivação de Pot1 são mediados por Rad3/ATR. a,** Distribuição do comprimento celular (µm), após germinação dos esporos, das estirpes *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>* (—) e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>* (—), ao longo do tempo. **b,** Células representativas da população *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>*, após 24h em meio selectivo. Estão representadas imagens de microscopia de contraste de fase (DIC) (painel da esquerda), e imagens de células com coloração do DNA (com DAPI) e dos septos (com calcofluor) (painel da direita).

Contrariamente à estirpe *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>*, na ausência de Rad3 verifica-se que não ocorre uma paragem do ciclo celular. As células dividem-se normalmente, não aumentando o tamanho ao longo do tempo. Neste caso, a população final apresenta uma distribuição dos tamanhos celulares muito semelhante à estirpe selvagem, havendo uma variação dos comprimentos entre 4 e 16µm (Figura 3a e b).

Verifica-se, no entanto, a presença de algumas células alongadas nos tempos mais tardios. Pela análise dos núcleos das células verificou-se que, enquanto nas estirpes *rad3<sup>-</sup>* e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>* a grande maioria das células permaneciam uninucleadas, na ausência de Pot1 observou-se um decréscimo destas células, sendo que, após 24h, 80% das células apresentavam núcleos aberrantes. Assim, a presença de algumas células alongadas nesta estirpe é provavelmente originada por morte celular (Figura 4).



**Figura 4. Remoção de Rad3 numa estirpe *pot1<sup>-</sup>* conduz ao aparecimento de células com núcleos aberrantes.** Representação gráfica da frequência de células uninucleadas (●), células binucleadas (□) e células com núcleos aberrantes (▲), nas estirpes *rad3<sup>-</sup>*, *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>*, *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>rad3<sup>-</sup>*, em diferentes tempos ao longo de 24h.

A remoção da cinase de checkpoint Rad3 leva assim à recuperação do tamanho celular normal. Estes resultados mostram que o alongamento celular causado pela ausência de Pot1 se deve, de facto, à activação de *checkpoints* via Rad3/ATR.

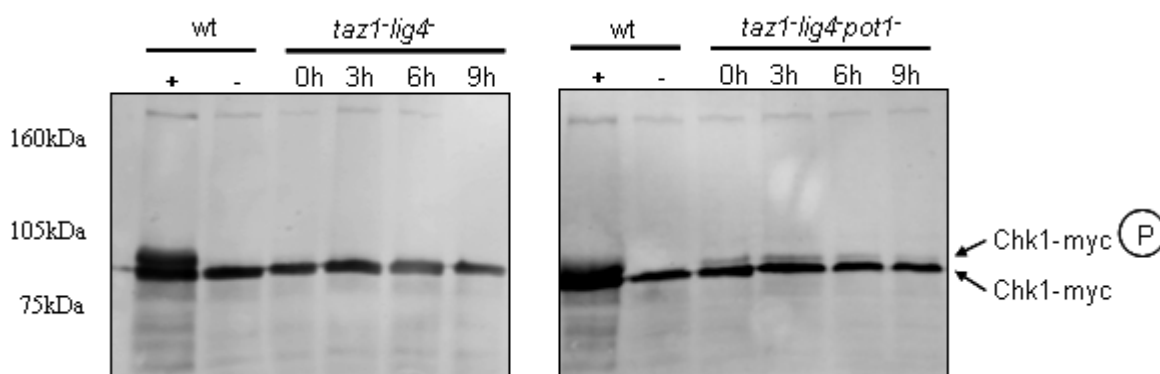
### 3.3 A remoção de *Pot1* de telómeros *taz1<sup>-</sup>* de *S. pombe* conduz à fosforilação de *Chk1*

Para além do alongamento celular, é também possível demonstrar bioquimicamente a ocorrência de *checkpoints* resultantes de dano do DNA, pela análise do estado de fosforilação da proteína da via de *checkpoints*, Chk1. Tal como já referido, esta proteína é essencial na paragem do ciclo celular, sendo fosforilada após dano do DNA (Walworth e Bernards, 1996). O estado de fosforilação das proteínas pode ser visualizado por Western-Blot, sob a forma de um atraso na migração electroforética da proteína em estudo. Neste estudo, procedeu-se á



fusão do gene endógeno Chk1 com o gene que codifica o epítipo myc, de forma a poder ser observada a migração da proteína Chk1 em Western-Blot através de um anticorpo anti-myc (ver Materiais e Métodos). As estirpes *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>*Chk1-myc e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>*Chk1-myc foram submetidas ao mesmo tipo de ensaio de crescimento celular e posteriormente analisadas por Western-Blot.

Em ambos os casos, o controlo positivo refere-se a uma estirpe selvagem sujeita a tratamento com bleomicina, uma droga que leva à formação de inúmeras quebras por todo o DNA celular, resultando numa forte resposta de fosforilação de Chk1 (Figura 5). No caso da estirpe *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>+</sup>*Chk1-myc verifica-se a presença de uma banda com, aproximadamente, 85 kDa, correspondente a 56,5 kDa da proteína Chk1 no seu estado não fosforilado e 30 kDa do epítipo myc. Contudo, não se observa qualquer atraso na migração electroforética desta proteína, indicativo do estado de fosforilação (Figura 5).



**Figura 5. Remoção de Pot1 origina fosforilação da cinase Chk1.** Western-blot de extractos proteicos das estirpes *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>* e *taz1<sup>-</sup>lig4<sup>-</sup>pot1<sup>-</sup>* colhidos ao longo de 9h, após a germinação dos esporos. A banda com, aproximadamente, 85KDa corresponde à proteína Chk1 não fosforilada com o epítipo myc. O atraso na migração desta proteína corresponde ao seu estado fosforilado. A detecção foi efectuada pelo uso do anticorpo anti-myc. O controlo positivo (+) corresponde a uma estirpe selvagem após tratamento com bleomicina, que origina inúmeras quebras no DNA. O controlo negativo (-) corresponde a uma estirpe selvagem em fase exponencial.

Pelo contrário, na ausência de Pot1, verifica-se não só a presença da banda correspondente a Chk1, mas é também possível distinguir acima desta, uma banda ténue correspondente à forma fosforilada de Chk1 (Figura 5). A fraca intensidade desta banda deve-se possivelmente ao facto da fosforilação ser resultado de apenas seis telómeros desprotegidos em cada célula, o que contrasta com a forte resposta causada pelo tratamento com bleomicina.

Em conjunto com os dados anteriores, estes resultados indicam que Pot1 é uma proteína com função de protecção telomérica, com capacidade de prevenção da activação de *checkpoints* via Rad3/ATR nos telómeros.

## Discussão

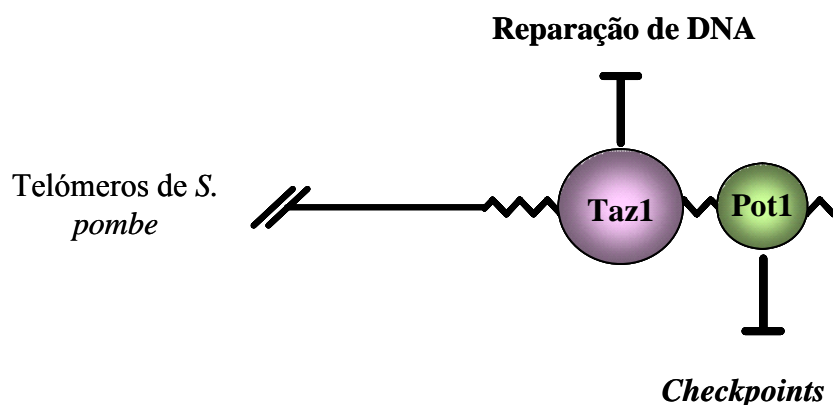
As extremidades dos cromossomas lineares são muito semelhantes a quebras na cadeia dupla de DNA. Contudo, contrariamente a quebras no DNA, os telómeros apresentam mecanismos que os protegem da activação dos mecanismos de reparação do DNA e da activação dos mecanismos de *checkpoints* de danos do DNA

Verificou-se que na ausência da proteína Taz1, ortóloga das proteínas humanas TRF1 e TRF2 (Cooper et al, 1997; Li et al, 2000), embora sejam activadas as vias de reparação de DNA, os *checkpoints* de dano do DNA permanecem inactivos, (Miguel G. Ferreira, não publicado) o que sugere que a activação da via de *checkpoints* é bloqueada por outro constituinte telomérico.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que Pot1 é uma proteína necessária à prevenção da activação de *checkpoints* em *S. pombe*. Aquando da remoção da proteína Pot1 numa estirpe *taz1 lig4*, observa-se um alongamento das células ao longo do tempo, resultante da activação de *checkpoints*. É importante realçar que esta activação ocorre em células que apresentam telómeros, pois assim sabemos que a activação de *checkpoints* não resulta da perda de telómeros, mas sim da perda da proteína responsável pela prevenção de *checkpoints* nos telómeros. Além do alongamento celular, verificou-se também que ocorre a fosforilação da proteína Chk1 nestas células. Chk1 é uma proteína essencial na paragem do ciclo celular, sendo a sua fosforilação indicativa da activação de *checkpoints* nas células. Pela remoção da cinase de checkpoint Rad3, observou-se uma recuperação do tamanho celular normal, mostrando que o alongamento celular causado pela ausência de Pot1 se deve à activação de *checkpoints* via Rad3/ATR.

Em conjunto, estes resultados mostram que os telómeros apresentam funções separadas na prevenção da activação de vias de reparação de DNA e de vias de *checkpoint*, efectuado pelas proteínas Taz1 e Pot1, respectivamente (Figura 6). Os mecanismos pelos quais esta prevenção ocorre ainda não são compreendidos. Podemos especular que a via de activação de *checkpoints* Rad3/ATR é bloqueada por Pot1. Embora haja recrutamento de Rad3 em resposta a dano de DNA, verifica-se que não ocorre fosforilação de Chk1. Desta

forma, Pot1 seria o responsável pelo bloqueio da via de *checkpoints*, actuando ao nível das proteínas a jusante de Rad3, tal como Crb2 (ver Figura 2 em anexo).



**Figura 6. Modelo representativo da repressão da resposta a dano de DNA nos telómeros em *S. pombe*.** A reparação de DNA e a activação de *checkpoints* são inibidos independentemente por Taz1 e Pot1, respectivamente.

Em mamíferos, as proteínas TRF1 e TRF2 ligam-se à região de dupla cadeia, enquanto a ligação de POT1 ocorre na zona de DNA de cadeia simples. Para além da sua ligação à região 3' projectada dos telómeros, a proteína Pot1 liga-se também à região de cadeia dupla através de interacção com TPP1. Em estudos recentes, verificou-se que a remoção de TRF2 dos telómeros de mamíferos leva à activação de vias de reparação do DNA e activação da via de *checkpoint* ATM. Consistente com os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que a disrupção de POT1 resulta na activação da via de *checkpoint* ATR (Denchi e de Lange, 2007; Guo et al., 2007). Para além disso, observou-se que a activação de ambas as vias ocorre de forma independente da outra via.: a remoção de POT1 origina uma resposta ATR em células ATM<sup>-/-</sup> e a via ATR não é necessária para a activação de ATM nos telómeros. Aquando da remoção de TRF2, a via ATM é activada sem a contribuição de ATR, que permanece bloqueada provavelmente pela ligação residual de POT1 nas extremidades do cromossoma. Colectivamente, estes resultados mostram que as proteínas TRF2 e POT1 têm funções independentes na prevenção da activação das vias de *checkpoint* ATM e ATR, respectivamente, nas extremidades dos cromossomas.

Assim, observam-se semelhanças e diferenças entre *S. pombe* e células de mamíferos. Em ambos os casos, a proteína Taz1/TRF2 protege as extremidades dos cromossomas da activação de vias de reparação do DNA, promovendo desta forma a estabilidade genómica.

Paralelamente, a proteína Pot1 apresenta um papel de prevenção de *checkpoints* via Rad3/ATR. Na ausência desta proteína, a projecção 3' dos telómeros fica desprotegida, o que resulta na activação de *checkpoints* de dano do DNA, ocorrendo uma paragem do ciclo celular. Desta forma, Pot1 desempenha um papel fundamental na protecção telomérica, sendo determinante na viabilidade celular em *S. pombe*.

Contrariamente a Taz1 de *S. pombe*, a proteína TRF2 parece desempenhar um papel importante na prevenção de *checkpoints* nos telómeros de mamíferos, inibindo a activação da via ATM. Tal como já foi referido, em mamíferos, além da ligação à cadeia simples de DNA na extremidade 3' projectada, Pot1 liga-se também à cadeia dupla de DNA telomérico por interacção com TPP1, que por sua vez se liga a TRF2 através de TIN2. Assim, como resultado da remoção de TRF2 dos telómeros, ocorre também remoção de POT1 da região de cadeia dupla do DNA telomérico. Desta forma, uma possível explicação para as diferenças encontradas entre *S. pombe* e mamíferos, relativamente a Taz1 e TRF2, é o facto da activação da via de *checkpoint* ATM em mamíferos ser resultado de uma diminuição da ligação de POT1 aos telómeros, aquando da remoção de TRF2.

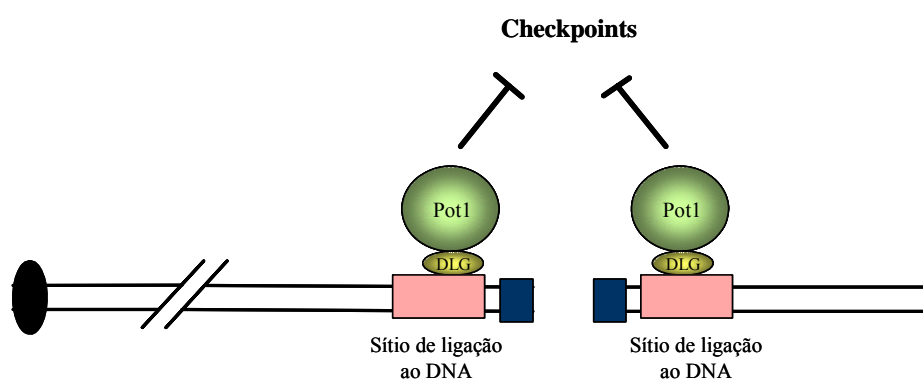
Outra possível explicação para as diferenças encontradas reside no facto da proteína Tel1, homóloga de ATM em mamíferos, não activar *checkpoints* em *S. pombe*, o que explica a inexistência da activação da via ATM em células *taz1<sup>-</sup>*.

Por outro lado, a disrupção de *taz1<sup>+</sup>* resulta num alongamento das sequências repetitivas das regiões de dupla cadeia do DNA telomérico e desregulação da projecção de cadeia simples 3' (Cooper et al., 1997), existindo desta forma uma maior quantidade de Pot1 ligada aos telómeros. Assim, é ainda possível que em *S. pombe*, contrariamente a células de mamíferos, a ligação da proteína Pot1 seja suficiente para a prevenção de *checkpoints*.

Neste sentido, está a ser desenvolvido um ensaio que permitirá esclarecer se a proteína Pot1 é suficiente para a inibição de *checkpoints*. Este ensaio é baseado num sistema previamente estabelecido (Pruden et al., 2003), onde um único DSB é gerado *in vivo*, num sítio específico, MATa (Osman et al., 1996), pelo uso da endonuclease HO de *S. cerevisiae* sob o controlo de um promotor indutível. Como uma falha na reparação do DNA pode resultar em morte celular, o sítio MATa foi integrado num mini-cromossoma não essencial, Ch16, que deriva do cromossoma III de *S. pombe* (Niwa et al., 1986), facilitando deste forma a análise genética. Assim, foi já construída uma estirpe de *S. pombe* com sequências nucleotídicas Gal4 colocados adjacente ao local de corte da endonuclease HO. Procedeu-se também à construção de proteínas teloméricas quiméricas, como Pot1, fundidas com um domínio de ligação ao DNA (DLG – Domínio de Ligação Gal4). Este domínio é

reconhecido pela sequência Gal4, podendo desta forma ser especificamente recrutadas para o local adjacente ao sítio de restrição no DNA. (Figura 7).

Aquando da indução da quebra no DNA, será testada a actividade de anti-*checkpoint* da proteína em estudo, pela capacidade de prevenção de uma resposta de dano no DNA no local de quebra, tal como o fazem normalmente nos telómeros. Este sistema permitirá posteriormente testar a ligação de outros candidatos e dissecar os componentes intervenientes na resposta de anti-*checkpoint*.



**Figura 7. Prevenção de *checkpoints* num local de quebra do DNA pela ligação de uma proteína com função anti-*checkpoint*.** Esquema representativo da ligação específica da proteína quimérica Pot1 fundida com um domínio de ligação Gal4 ao DNA (DLG) a locais adjacentes a uma quebra no DNA. A quebra é gerada num local específico, MATa, pelo uso da endonuclease HO. Hipoteticamente, a ligação desta proteína previne a activação de *checkpoints* neste local de quebra.

A compreensão do mecanismo pelo qual os telómeros protegem as extremidades dos cromossomas de *checkpoints* e reparação de DNA e, em sua falha, como as células respondem a telómeros disfuncionais permitirá desvendar os passos iniciais do processo de tumorigénese. A identificação dos componentes principais nestes eventos irá fornecer alvos específicos para intervenção terapêutica de tratamento e/ou prevenção, assim como possíveis alvos para o diagnóstico precoce de tumores.

## Referências bibliográficas

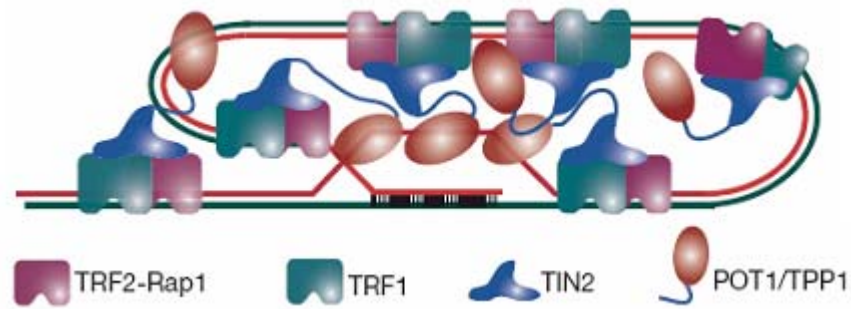
- al-Khodairy F, Carr AM (1992) DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **11**(4): 1343-1350
- al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Lehmann AR, Carr AM (1994) Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Mol Biol Cell* **5**(2): 147-160
- Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**(10): 943-951
- Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**(5519): 1171-1175
- Bentley NJ, Holtzman DA, Flaggs G, Keegan KS, DeMaggio A, Ford JC, Hoekstra M, Carr AM (1996) The *Schizosaccharomyces pombe* rad3 checkpoint gene. *EMBO J* **15**(23): 6641-6651
- Burma S, Chen BP, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**(9-10): 1042-1048
- Chandra A, Hughes TR, Nugent CI, Lundblad V (2001) Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev* **15**(4): 404-414
- Chikashige Y, Hiraoka Y (2001) Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol* **11**(20): 1618-1623
- Churikov D, Wei C, Price CM (2006) Vertebrate POT1 restricts G-overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection. *Mol Cell Biol* **26**(18): 6971-6982
- Cooper JP, Nimmo ER, Allshire RC, Cech TR (1997) Regulation of telomere length and function by a Myb-domain protein in fission yeast. *Nature* **385**(6618): 744-747
- d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**(15): 1781-1799
- de Lange T (2004) T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(4): 323-329
- de Lange T (2005a) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**(18): 2100-2110
- De Lange T (2005b) Telomere-related genome instability in cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 197-204
- Denchi EL, de Lange T (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**(7157): 1068-1071
- Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**(5293): 1664-1672
- Ferreira MG, Cooper JP (2001) The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol Cell* **7**(1): 55-63
- Ferreira MG, Cooper JP (2004) Two modes of DNA double-strand break repair are reciprocally regulated through the fission yeast cell cycle. *Genes Dev* **18**(18): 2249-2254
- Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP (2004) Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* **13**(1): 7-18
- Ford JC, al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Carr AM (1994) 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science* **265**(5171): 533-535
- Gardner RD, Burke DJ (2000) The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol* **10**(4): 154-158
- Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6128-6138
- Getts RC, Stamato TD (1994) Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the *xrs* double-strand DNA repair-deficient mutant. *J Biol Chem* **269**(23): 15981-15984
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-413
- Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**(6): 887-898
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205): 331-337
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-514

- Guo X, Deng Y, Lin Y, Cosme-Blanco W, Chan S, He H, Yuan G, Brown EJ, Chang S (2007) Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J* **26**(22): 4709-4719
- Hardwick KG (1998) The spindle checkpoint. *Trends Genet* **14**(1): 1-4
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-460
- Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, et al. (1994) Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 307-315
- Hartwell LH, Weinert TA (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**(4930): 629-634
- Hockemeyer D, Daniels JP, Takai H, de Lange T (2006) Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* **126**(1): 63-77
- Hug N, Lingner J (2006) Telomere length homeostasis. *Chromosoma* **115**(6): 413-425
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**(5): 687-696
- Jacob NK, Kirk KE, Price CM (2003) Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage. *Mol Cell* **11**(4): 1021-1032
- Jacob NK, Lescasse R, Linger BR, Price CM (2007) Tetrahymena POT1a regulates telomere length and prevents activation of a cell cycle checkpoint. *Mol Cell Biol* **27**(5): 1592-1601
- Kanoh J, Ishikawa F (2001) spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol* **11**(20): 1624-1630
- Keeney JB, Boeke JD (1994) Efficient targeted integration at leu1-32 and ura4-294 in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**(3): 849-856
- Kelleher C, Kurth I, Lingner J (2005) Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* **25**(2): 808-818
- Kim SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J (2004) TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* **279**(42): 43799-43804
- Lei M, Podell ER, Baumann P, Cech TR (2003) DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. *Nature* **426**(6963): 198-203
- Li B, Oestreich S, de Lange T (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**(5): 471-483
- Lindsay HD, Griffiths DJ, Edwards RJ, Christensen PU, Murray JM, Osman F, Walworth N, Carr AM (1998) S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* **12**(3): 382-395
- Lingner J, Cooper JP, Cech TR (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**(5230): 1533-1534
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**(5312): 561-567
- Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, Qin J, Songyang Z (2004) PTP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* **6**(7): 673-680
- Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1-senescence. *Cell* **73**(2): 347-360
- Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**(4): 633-643
- Miller KM, Ferreira MG, Cooper JP (2005) Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. *EMBO J* **24**(17): 3128-3135
- Mitton-Fry RM, Anderson EM, Hughes TR, Lundblad V, Wuttke DS (2002) Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**(5565): 145-147
- Moreno S, Klar A, Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823
- Naito T, Matsuura A, Ishikawa F (1998) Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nat Genet* **20**(2): 203-206
- Nakamura TM, Cech TR (1998) Reversing time: origin of telomerase. *Cell* **92**(5): 587-590
- Niwa, O., Matsumoto, T. and Yanagida, M. (1986) Construction of a minichromosome by deletion and its mitotic and meiotic behaviour in fission yeast. *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 397-405.
- O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM (2000) The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol* **10**(7): 296-303
- O'Reilly M, Teichmann SA, Rhodes D (1999) Telomerases. *Curr Opin Struct Biol* **9**(1): 56-65
- Osman F, Fortunato EA, Subramani S (1996) Double-strand break-induced mitotic intrachromosomal recombination in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **142**(2): 341-357

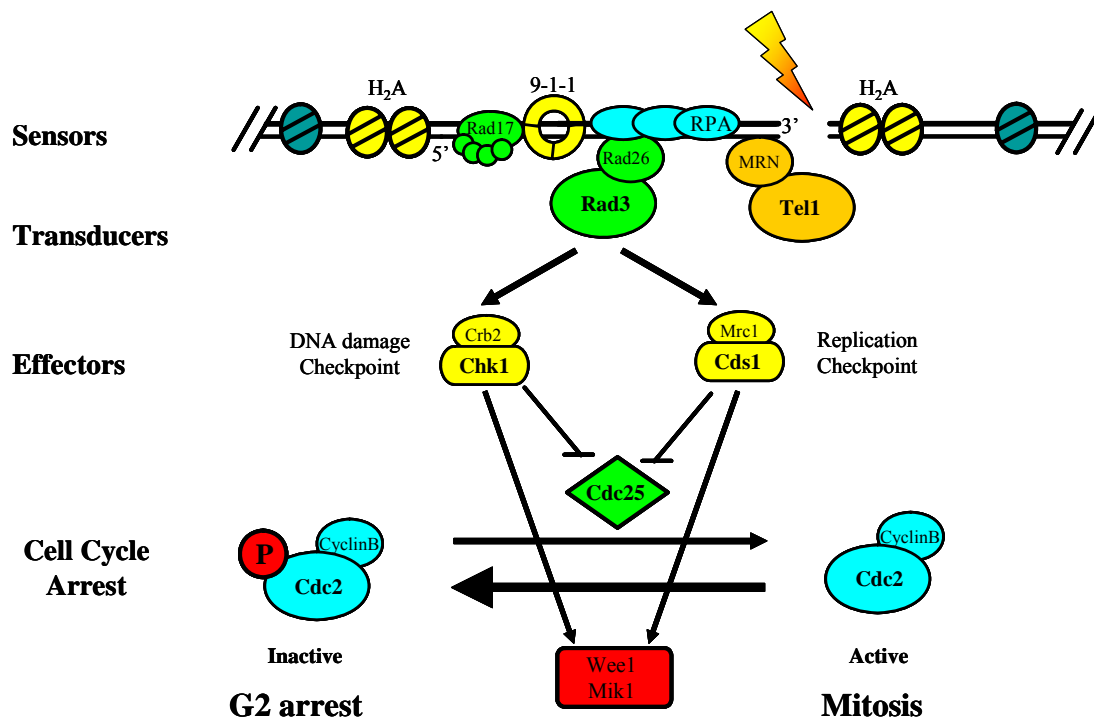
- Price CM, Cech TR (1987) Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev* **1**(8): 783-793
- Prudden, J., J. S. Evans, S. P. Hussey, B. Deans, P. O'Neill, J. Thacker, and T. Humphrey. 2003. Pathway utilization in response to a site-specific DNA double-strand break in fission yeast. *Embo J* **22**:1419-30
- Sandell LL, Zakian VA (1993) Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* **75**(4): 729-739
- Schramke V, Luciano P, Brevet V, Guillot S, Corda Y, Longhese MP, Gilson E, Geli V (2004) RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nat Genet* **36**(1): 46-54
- Shakirov EV, Surovtseva YV, Osbun N, Shippen DE (2005) The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7725-7733
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**(17): 1549-1556
- Tomita K, Matsuura A, Caspari T, Carr AM, Akamatsu Y, Iwasaki H, Mizuno K, Ohta K, Uritani M, Ushimaru T, Yoshinaga K, Ueno M (2003) Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Mol Cell Biol* **23**(15): 5186-5197
- Trujillo KM, Bunch JT, Baumann P (2005) Extended DNA binding site in Pot1 broadens sequence specificity to allow recognition of heterogeneous fission yeast telomeres. *J Biol Chem* **280**(10): 9119-9128
- Tuzon CT, Borgstrom B, Weilguny D, Egel R, Cooper JP, Nielsen O (2004) The fission yeast heterochromatin protein Rik1 is required for telomere clustering during meiosis. *J Cell Biol* **165**(6): 759-765
- Verdun, R.E. and Karlseder, J. Replication and protection of telomeres. *Nature* **447**, 924–931 (2007).
- Walworth NC, Bernards R (1996) rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* **271**(5247): 353-356
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciú P, Cech TR, Lei M (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445**(7127): 506-510
- Wei C, Price CM (2004) Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1. *Mol Cell Biol* **24**(5): 2091-2102
- Weinert TA, Hartwell LH (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**(4863): 317-322
- Wellinger RJ, Ethier K, Labrecque P, Zakian VA (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**(3): 423-433
- West SC (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(6): 435-445
- Wood V, Gwilliam R, Rajandream MA, Lyne M, Lyne R, Stewart A, Sgouros J, Peat N, Hayles J, Baker S, Basham D, Bowman S, Brooks K, Brown D, Brown S, Chillingworth T,
- Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara H, Bailey SM, Behringer RR, Chang S (2006) Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* **126**(1): 49-62
- Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* **40**: 363-383
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* **445**(7127): 559-562
- Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH (1990) In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated *Tetrahymena* telomerase RNAs. *Nature* **344**(6262): 126-132
- Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* **300**(5625): 1542-1548



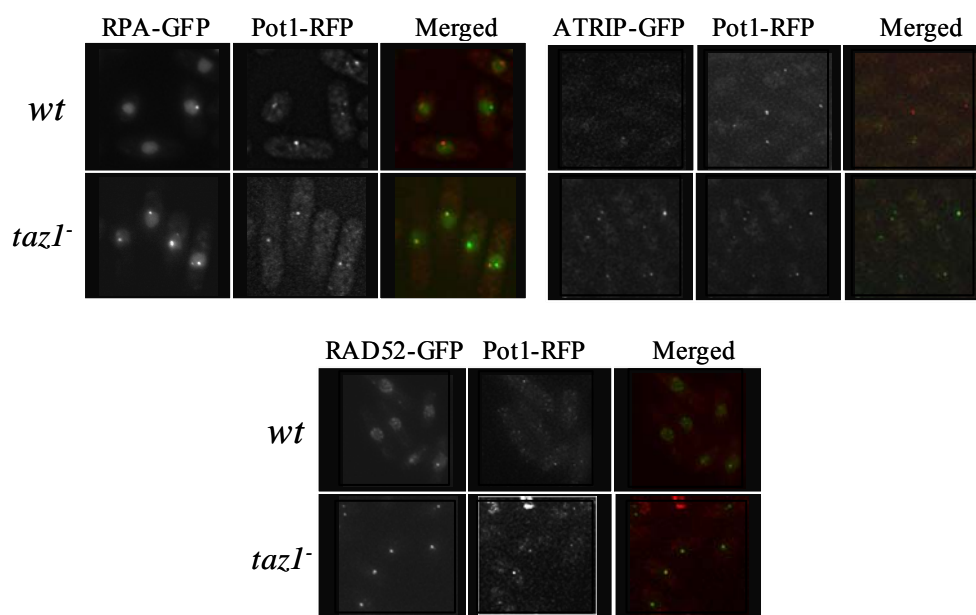
## Anexos



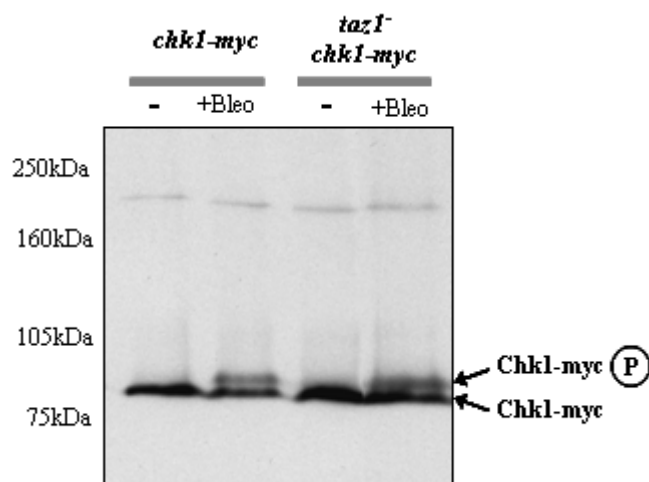
**Figura 1. Modelo do t-loop nos telômeros.** Através da ligação entre as várias proteínas teloméricas, a projecção 3' de cadeia simples é sequestrada numa estrutura semelhante a um laço, ocultando a extremidade dentro da dupla cadeia.



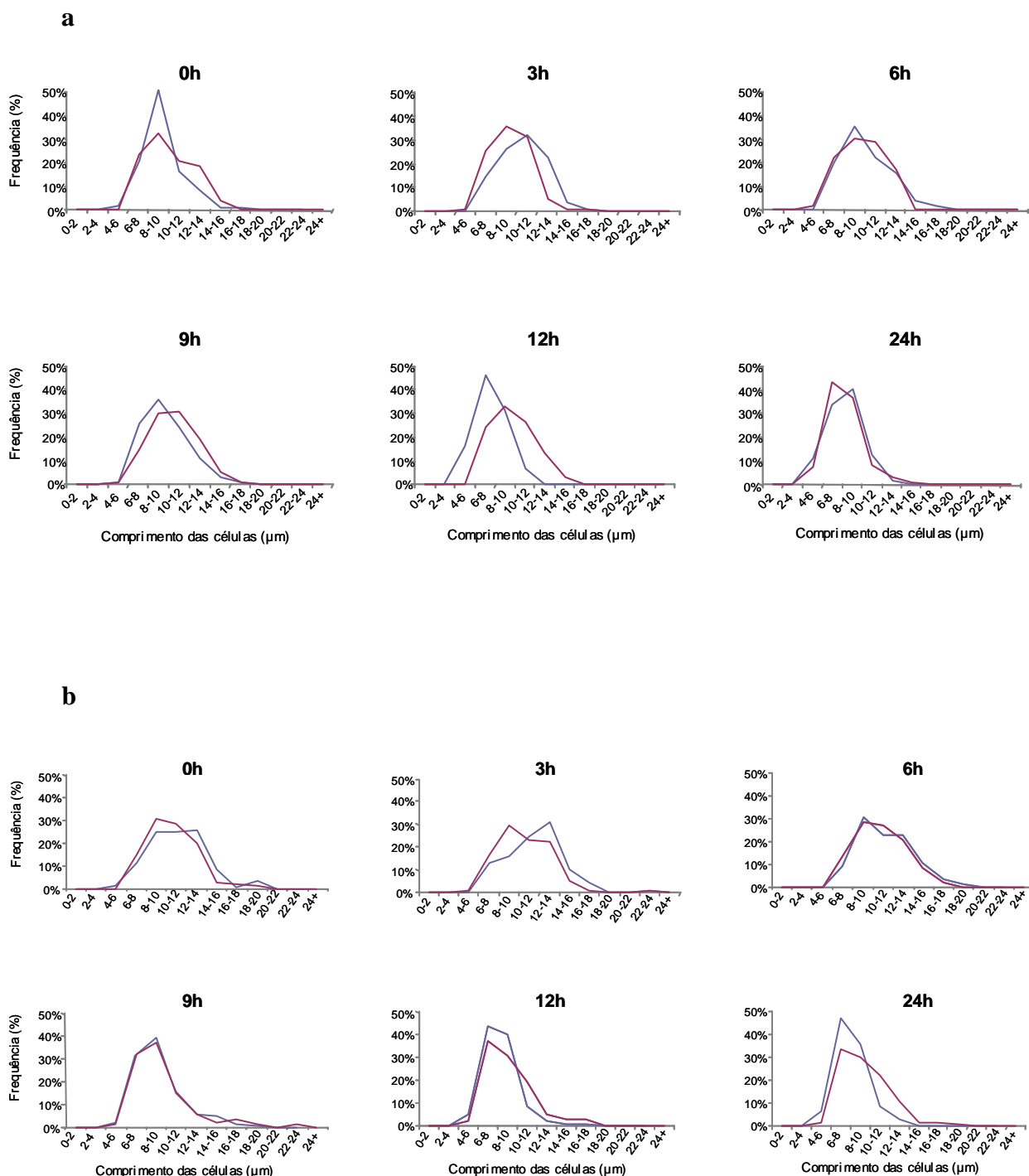
**Figura 2. Vias de *checkpoint* do ciclo celular.** Em resposta a dano do DNA ocorre activação de *checkpoint* que resulta numa paragem do ciclo celular. As vias de *checkpoint* são caracterizadas por cascatas de eventos de fosforilação de proteínas, ocorrendo alteração da actividade, estabilidade ou localização das proteínas modificadas.



**Figura 3. Os mecanismos de reparação de DNA são activados aquando da remoção de Taz1.** As proteínas envolvidas nos mecanismos de dano de DNA, RPA, ATRIP e RAD52, foram fundidas com GFP. Como controlo da localização dos telómeros foi efectuada a fusão de Pot1 com RFP. Verifica-se que as proteínas de dano são recrutadas para os telómeros na ausência de Taz1, comprovado pela sua co-localização com a proteína telomérica Pot1. Como controlo negativo foi usada a estirpe selvagem.



**Figura 4. A remoção de Taz1 não conduz à fosforilação da Chk1.** Western-blot de extractos proteicos das estirpes Chk1-myc e *taz1*<sup>-</sup> Chk1-myc, pelo uso do anticorpo anti-myc. A banda com, aproximadamente, 85KDa corresponde à proteína Chk1 não fosforilada com o epítipo myc. O atraso na migração desta proteína corresponde ao seu estado fosforilado. Verifica-se que células *taz1*<sup>-</sup> não activam as vias de *checkpoint*, embora mantenham a capacidade de fosforilar a cinase Chk1, comprovado com o tratamento com bleomicina.



**Figura 5. Remoção de Rad3 não tem influência na divisão celular.** Distribuição do comprimento celular (μm), após germinação dos esporos, ao longo do tempo. **a**, Comparação do comprimento celular (μm) das estirpes selvagem (—) e *rad3<sup>-</sup>* (—). **b**, Comparação do comprimento celular (μm) das estirpes *taz1 lig4<sup>-</sup>* (—) e *taz1 lig4<sup>-</sup> rad3<sup>-</sup>* (—).